

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
BIOLOŠKI ODSJEK

Luka Čulig

**Socijalno i emotivno ponašanje štakora nakon perinatalne  
primjene tranilcipromina**

Diplomski rad

Zagreb, 2011.

Ovaj diplomski rad izrađen na Zavodu za animalnu fiziologiju Biološkog osjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod voditeljstvom doc. dr. sc. Dubravke Hranilović, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno- matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja dipl. ing. biologije, smjer molekularna biologija.



## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno- matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

### **SOCIJALNO I EMOTIVNO PONAŠANJE ŠTAKORA NAKON PERINATALNE PRIMJENE TRANILCIPROMINA**

Luka Čulig  
Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu  
Biološki odsjek, Zavod za animalnu fiziologiju  
Rooseveltove trg 6, Zagreb

### **SAŽETAK**

Serotonin (5-hidroksitriptamin, 5-HT) je biološki aktivan amin. Nalazi se u mozgu i na periferiji gdje vrši različite fiziološke uloge, a također kontrolira razvoj mozga. Promjene u sustavu koji regulira metabolizam i funkciju 5-HT mogle bi predstavljati jednu od mogućih bioloških podloga poremećaja ponašanja u koje spada i autizam. Smatra se da visoka razina 5-HT u krvi, u doba fetalnog i ranog postnatalnog razvoja, može inhibirati rast i razvoj 5-HT neurona i tako dovesti do anatomskih i funkcionalnih promjena u mozgu. Kako bi se ispitale posljedice visoke razine 5-HT u krvi u doba perinatalnog razvoja na središnji odjeljak 5-HT, štakori su bili tretirani inhibitorom monoamin oksidaze (MAOI), tranilciprominom (TCP, 2mg/kg), od 13. embrionalnog do 21. postnatalnog dana života. U ovom radu smo istražili posljedice perinatalnog tretmana s MAOI na kognitivno, socijalno i emotivno ponašanje štakora. Eksperimentalne štakore tretirane TCP-om i kontrolne štakore tretirane fiziološkom otopinom podvrgnuli smo bateriji testova ponašanja kojima smo redom ispitali: učenje i kognitivnu rigidnost, lokomotorno ponašanje, anksioznost i eksploratorno ponašanje, socijabilnost te reakciju i habituaciju na opetovani zvučni podražaj. Skupina tretirana TCP-om pokazala je smanjenu razinu anksioznosti i kognitivne rigidnosti te povećanu razinu eksploratornog ponašanja i socijabilnosti u odnosu na kontrolnu skupinu. Razina lokomotornog gibanja nije se razlikovala između skupina. Rezultati pokazuju da je perinatalni tretman inhibitorom razgradnje serotonina utjecao na ponašanja regulirana serotoninom, što ukazuje na promjene u središnjem odjeljku 5-HT nastale tijekom razvoja mozga.

(39 stranica, 17 slika, 78 literaturna navoda, jezik izvornika: Hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: tranilcipromin, serotonin, štakor, ponašanje, hiperserotoninemija

Voditelj: dr. sc. Dubravka Hranilović, izv. prof.

Ocjenitelji: dr. sc. Perica Mustafić, doc., dr. sc. Jasna Hrenović, izv. prof.

Rad prihvaćen: 9.3.2011.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Division of Biology

Graduation thesis

### **SOCIAL AND EMOTIONAL BEHAVIOUR IN RATS AFTER PERINATAL TREATMENT WITH TRANYLCPROMINE**

Luka Čulig  
Faculty of Science, University of Zagreb  
Division of Biology, Department of Animal Physiology  
Rooseveltova trg 6, Zagreb

#### **ABSTRACT**

Serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) is a biologically active amine present in both brain and peripheral tissues where it serves different physiological functions and it also regulates brain development. Disruption of 5-HT metabolic pathway or impairments in its function could represent a base for different behavioral disorders including autism. During prenatal and early postnatal development, high concentrations of serotonin in blood could inhibit 5HT neuronal growth and differentiation and cause anatomical and functional changes in brain. To examine consequences of high blood 5-HT concentrations during perinatal development, rats were treated with monoamine oxidase inhibitor (MAOI), TCP (tranylcypromine, 2mg/kg) from 13th gestational day until 21st postnatal day. In this study we explored consequences of the mentioned perinatal treatment on cognitive, social and emotional behavior in rats. Experimental group (treated with TCP) and control group (treated with saline solution) of rats were submitted to the battery of tests. We examined learning and cognitive rigidity, locomotor activity, anxiety and exploratory behavior, sociability, and reaction and habituation to repeated high-frequency sound. Experimental group displayed significantly lower level of anxiety and cognitive rigidity, and showed higher sociability and exploratory behavior. Levels of locomotor activity did not differ between the groups. These results show that the treatment with TCP has influenced 5-HT-regulated behaviors, and indicate changes in the central 5-HT compartment that occurred during brain development.

(39 pages, 17 figures, 78 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in Central biological library.

Key words: tranylcypromine, serotonin, rat, behaviour, hyperserotonemia

Supervisor: dr. Dubravka Hranilović, Assoc. Prof.

Reviewers: dr. Perica Mustafić, Asst. Prof., dr. Jasna Hrenović, Assoc. Prof.

Thesis accepted: 9.3.2011.

## POPIS KRATICA

<b>5-HIAA</b>	5-hidroksiindololactena kiselina
<b>5-HT</b>	5-hidroksitriptamin
<b>5-HTP</b>	5-hidroksitriptofan
<b>AADC</b>	dekarboksilaza aromatskih kiselina (eng. <i>amino acid decarboxylase</i> )
<b>MAO</b>	monoamin oksidaza
<b>MAOI</b>	inhibitor monoamin oksidaze
<b>NAD +</b>	nikotinamid adenin dinukleotid
<b>PEA</b>	$\beta$ -feniletilamin
<b>PND</b>	postnatalni dan
<b>SBP</b>	serotonin vezajući protein (eng. <i>serotonin-binding protein</i> )
<b>SERT</b>	serotoninski transporter (eng. <i>serotonin transporter</i> )
<b>SŽS</b>	središnji živčani sustav
<b>TCP</b>	tranilcipromin
<b>TPH</b>	triptofan hidroksilaza

## Sadržaj

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. SEROTONIN.....</b>	<b>2</b>
1.1.1. Serotoninski receptori.....	2
1.1.2. Metabolizam serotonina.....	2
<b>1.2. SEROTONINSKI ODJELJCI.....</b>	<b>4</b>
1.2.1. Serotoninski sustav u mozgu.....	4
1.2.2. Periferni serotoninski sustav.....	7
1.2.3. Povezanost središnjeg i perifernog serotoninskog sustava.....	8
<b>1.3. PROMJENE SEROTONINSKE HOMEOSTAZE.....</b>	<b>9</b>
1.3.1. Serotonin i poremećaji ponašanja.....	9
1.3.2. Autizam.....	10
1.3.3. Hiperserotoninemija.....	11
<b>1.4. INHIBITORI MONOAMIN OKSIDAZA.....</b>	<b>12</b>
<b>2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....</b>	<b>14</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE.....</b>	<b>16</b>
<b>3.1. MATERIJALI.....</b>	<b>17</b>
3.1.1. Životinje.....	17
3.1.2. Aparatura.....	17
<b>3.2. TESTOVI PONAŠANJA.....</b>	<b>20</b>
3.2.1. Učenje i kognitivna rigidnost.....	20
3.2.2. Lokomotorna aktivnost.....	21
3.2.3. Anksioznost i eksploratorno ponašanje.....	21
3.2.4. Socijalni izbor.....	21
3.2.5. Reakcija na uznemirujući zvučni podražaj.....	22
<b>3.3. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA.....</b>	<b>22</b>
<b>4. REZULTATI.....</b>	<b>24</b>
<b>4.1. UČENJE I KOGNITIVNA RIGIDNOST.....</b>	<b>25</b>
<b>4.2. LOKOMOTORNA AKTIVNOST.....</b>	<b>27</b>
<b>4.3. ANKSIOZNOST I EKSPLOATORNO PONAŠANJE.....</b>	<b>28</b>
<b>4.4. SOCIJALNI IZBOR.....</b>	<b>30</b>
<b>4.5. REAKCIJA NA OPETOVANI ZVUČNI PODRAŽAJ.....</b>	<b>32</b>
<b>5. RASPRAVA.....</b>	<b>34</b>
<b>6. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>38</b>
<b>7. LITERATURA.....</b>	<b>40</b>

# **1. UVOD**



## 1.1. SEROTONIN

Serotonin (5-hidroksitriptamin, skraćeno 5-HT) je monoaminski neurotransmitter i neuromodulator koji je biokemijski izveden od triptofana. M. Rapport i sur. su otkrili tvar s vazokonstriktorskim svojstvima u serumu i zbog toga ga nazvali serotonin (Rapport i sur. 1948). Kod sisavaca je serotonin prisutan i u mozgu i u perifernim tkivima. U središnjem živčanom sustavu nalaze se serotonergični neuroni smješteni u jezgrama rafe (lat. *raphé nuclei*) te mu je u mozgu funkcija reguliranje razvoja serotonergičnih neurona i ciljnih tkiva tijekom neurogeneze, a kasnije dobija funkciju neurotransmitera koji kontrolira širok spektar fizioloških sustava (Lucki 1998). U periferiji, 5-HT posreduje gastro-intestinalne funkcije i aktivaciju trombocita. 90% ukupne količine serotoninina se nalazi u perifernom odjeljku organizma gdje sudjeluje u mnogobrojnim fiziološkim procesima (Caspi i sur. 2008). Nalazimo ga u ranom razvoju mozga što implicira njegovu ulogu u umnožavanju, migraciji i diferencijaciji neurona (Whitaker-Azmitia 2001, 2005). Kod životinja se pojavljuje vrlo rano u evoluciji, od početaka bilateralno simetričnih životinja gdje regulira pokretanje crijeva i percepciju dostupnosti resursa, a pronalazimo ga i u nekih biljaka i gljiva (Kang i sur. 2009). Za razliku od svojih prekursora, 5-hidroksitriptofana (5-HTP) i triptofana, serotonin ne prolazi krvno-moždanu barijeru, što znači da unošenje serotoninina hranom nema utjecaj na razinu serotoninina u mozgu.

### 1.1.1. Serotoninski receptori

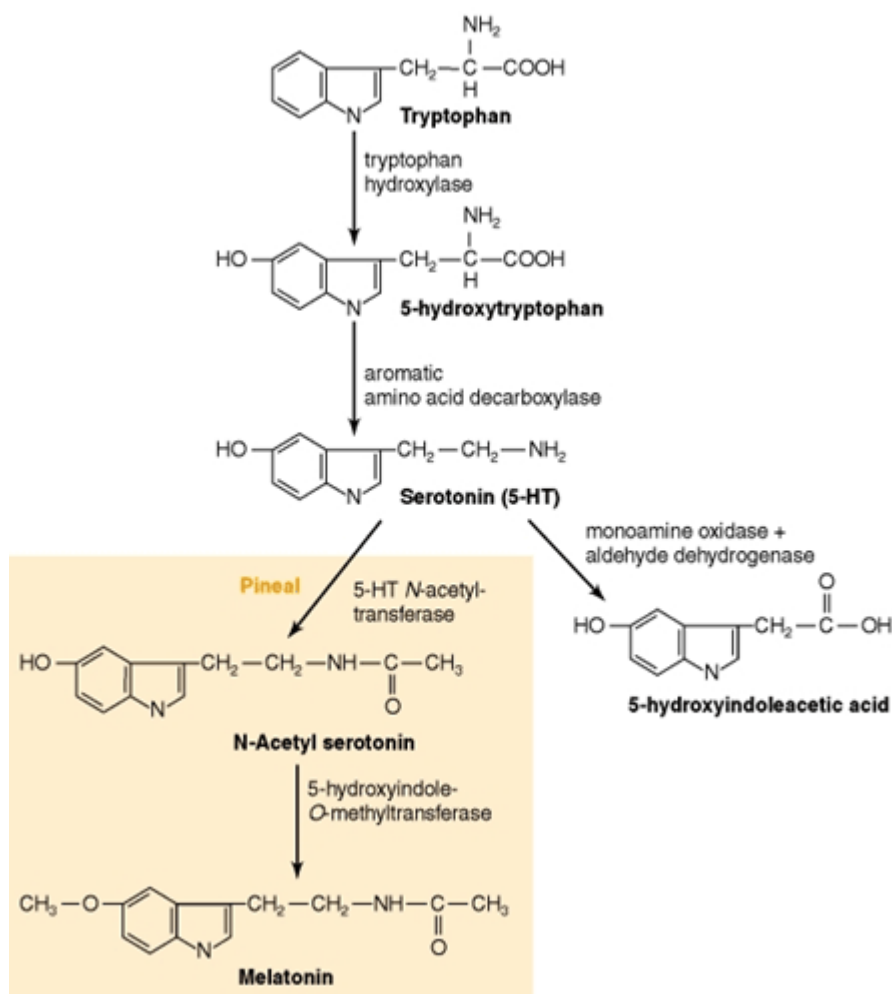
Serotonin se veže na 14 tipova 5-HT receptora grupiranih u 7 obitelji (od 5-HT<sub>1</sub> do 5-HT<sub>7</sub>) s obzirom na signalni mehanizam i primarnu strukturu receptora (Frazer i Hensler 1999). Svi tipovi su prisutni u mozgu, a pojedini su prisutni uglavnom u perifernim tkivima, na primjer 5-HT<sub>4</sub> se većinom nalazi u sluznici crijeva (Berger i sur. 2009). Uz izuzetak 5-HT<sub>3</sub> receptora, svi pripadaju nadobitelji receptora vezanih uz G-proteine (metabotropni receptori) koji modificiraju aktivnost ionskih kanala, adenilat ciklaze ili fosfolipaze C. 5-HT<sub>3</sub> receptori su ionski kanali (Frazer i Hensler 1999, Kolb i Whishaw 2005, [www.themedicalbiochemistrypage.org](http://www.themedicalbiochemistrypage.org)). Neki serotoninski receptori su presinaptički, a neki postsinaptički.

### 1.1.2. Metabolizam serotoninina

Kod životinja, uključujući i ljude, prvi korak u sintezi serotoninina je hidroksilacija L-triptofana. Taj korak katalizira enzim triptofan hidroksilaza (TPH), a on je ujedno i ograničavajući faktor

sinteze (Caspi i sur. 2008). Taj se enzim nalazi u serotonergičnim neuronima u središnjem živčanom sustavu (SŽS), u epifizi, enterokromafinim stanicama sluznice tankog crijeva, te u neuronima mijenteričnog plexusa (Côte i sur. 2003). Pokazano je da TPH postoji u dva oblika: TPH1, koji je prisutan u nekoliko tkiva i TPH2, izoforma specifična za mozak. Sličnost između TPH1 i TPH2 u slijedu aminokiselina iznosi 65% (Alenina i sur. 2008, Côte i sur. 2003, Savelieva i sur. 2008). Produkt hidroksilacije je nestabilni 5-hidroksitriptofan (5-HTP, oksitriptan) koji se u drugom koraku dekarboksilira uz pomoć enzima dekarboksilaze aromatskih kiselina (engl. *amino acid decarboxylase*, AADC) i vitamina B6 (Rahman i sur. 1982) te nastaje 5-HT. Ova reakcija događa se i u živčanom tkivu i u jetri (Bouchard i sur. 1981). Monoamin oksidaza (MAO) procesom oksidativne deaminacije pretvara 5-HT u 5-hidroksindolacetaldehid koji se dalje oksidira u 5-hidroksindolacetatnu kiselinu (5-HIAA), a taj proces katalizira aldehid dehidrogenaza ovisna o NAD<sup>+</sup>. U mozgu, 5-HIAA je primarni metabolit 5-HT (Caspi i sur. 2008).

Postoje dva izoenzima: MAO-A i MAO-B, koji različito regiraju na inhibitore i imaju različit afinitet za supstrate te se nalaze na različitim mjestima. Obje forme enzima nalazimo u neuronima i astroglij, a izvan SŽS-a, MAO-A nalazimo u jetri, gastrointestinalnom traktu i placenti, dok MAO-B nalazimo većinom u trombocitima. U serotonergičnim sinapsama MAO-A razgrađuje 5-HT, dok MAO-B veže agoniste koji bi mogli ometati normalan metabolizam 5-HT (Frazer i Hensler 1999). U perifernom odjeljku 5-HT se metabolizira u jetri te se u obliku 5-HIAA izlučuje urinom (Caspi i sur. 2008) (Slika 1.1)



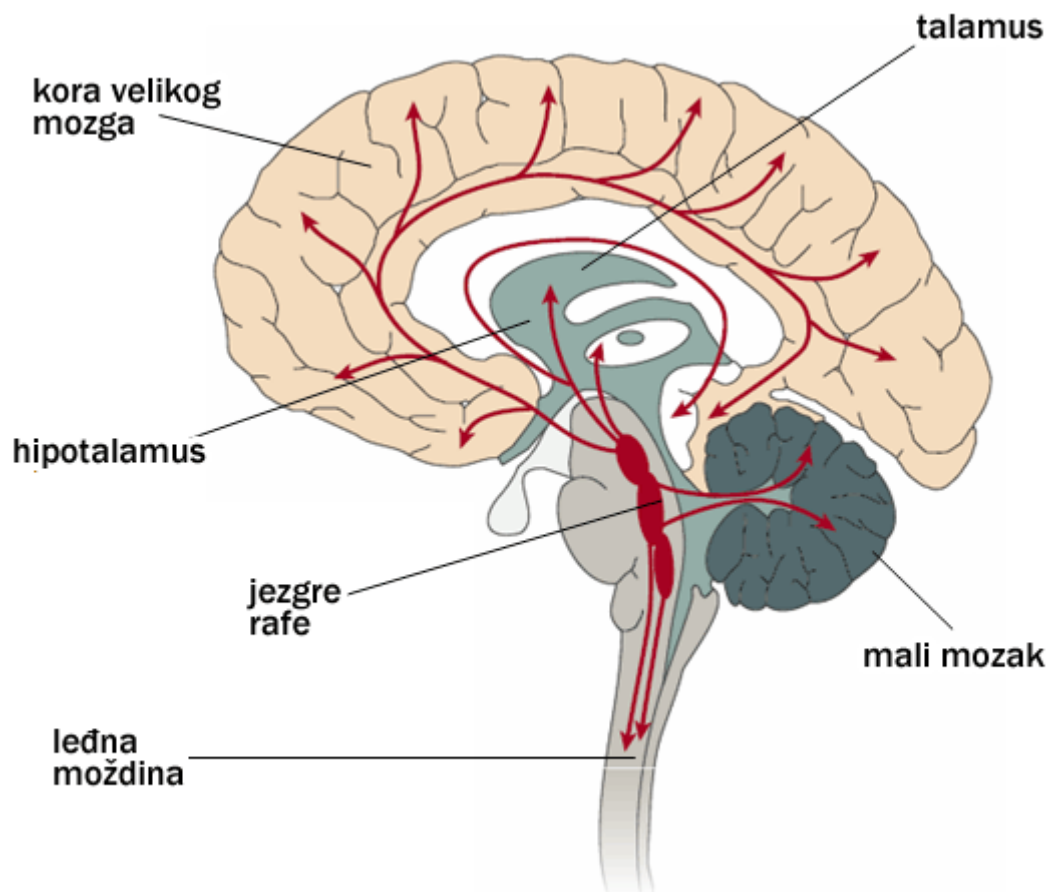
Slika 1.1. Metabolizam serotonina.

## 1.2. SEROTONINSKI ODJELJCI

### 1.2.1. Serotoninski sustav u mozgu

Tijela serotonergičnih neurona nalaze se uzduž dorzalne linije moždanog debla u području nazvanom jezgre rafe (lat. *raphé nuclei*), koje su podijeljene u devet skupina (B1- B9) (Slika 1.2). Aksoni tih stanica projiciraju u gotova sva područja mozga i moduliraju niz fizioloških procesa i ponašanja. Projekcije serotogeničnih neurona su topografski organizirane (Frazer i Hensler 1999). Mnogobrojne funkcije serotonina se mogu objasniti postojanjem preko 15 podtipova receptora koji moduliraju i podešavaju stanične odgovore na serotonin (Whitaker-Azmitia 2005, Whitaker-Azmitia i sur. 1996). Svi tipovi receptora su prisutni u svim strukturama mozga, a pojedine neurofiziološke procese i ponašanja regulira više tipova receptora. *Raphé nuclei* prima aferentna vlakna iz drugih dijelova moždanog debla (*substantia nigra*, ventralni tegmentum),

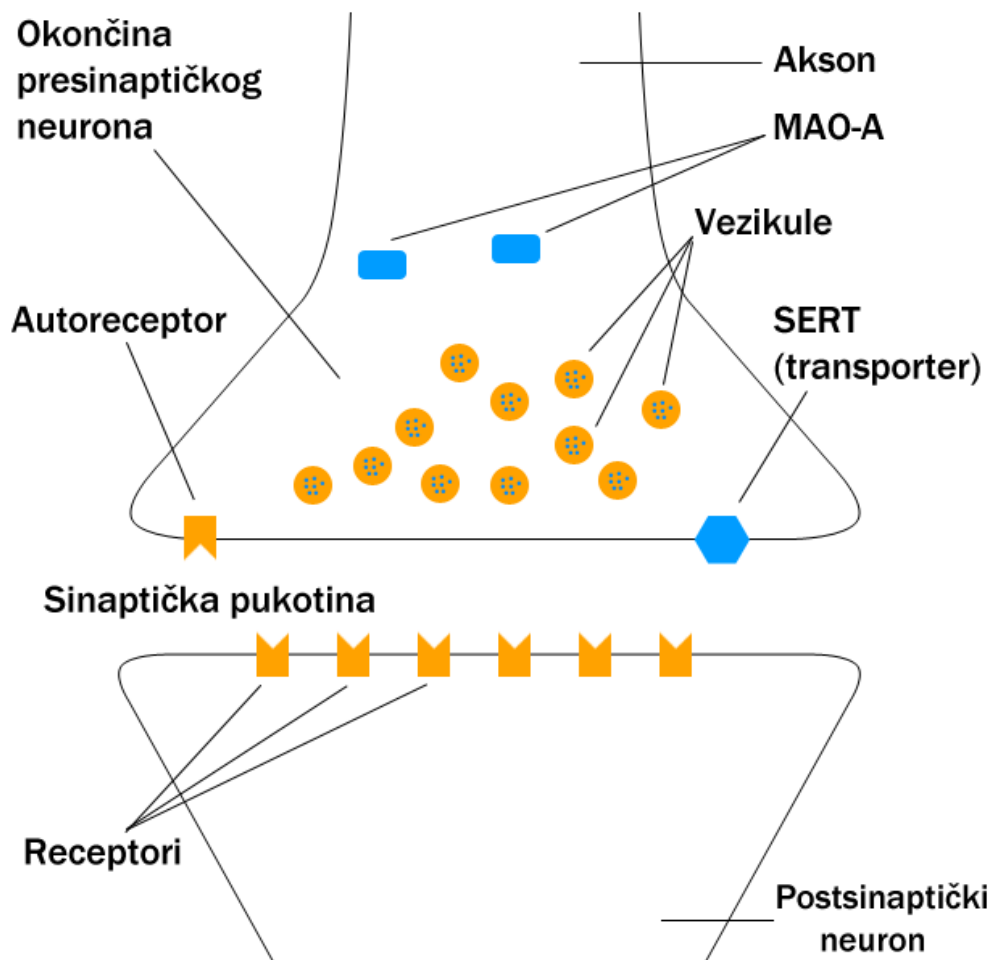
hipotalamusa, talamusa, limbičkih struktura, a i između grupa serotonergičnih neurona dolazi do regulacije (Frazer i Hensler 1999).



**Slika 1.2.** Projekcije serotonergičnih neurona smještenih u regiji *raphé nuclei*.

Slika 1.3. prikazuje serotonergičnu sinapsu. Serotonin, nakon sinteze u citoplazmi, mehanizmom aktivnog transporta ulazi u vezikule na aksonskim završecima serotonergičnih neurona, a unutar njih se veže na SBP (eng. *serotonin-binding protein*). Ispuštanje serotonina u sinaptičku pukotinu se događa egzocitozom posredstvom kompleksa  $\text{Ca}^{2+}$ -kalmodulin. Serotonin se zatim veže na jedan od tipova receptora i aktivira postsinaptički neuron. Da bi sinapsa pravilno funkcionirala, neurotransmiter mora imati ograničeno vremensko djelovanje unutar sinaptičke pukotine. Prekid djelovanja serotonina i povrat serotonina u presinaptički tj. serotonergični neuron se odvija aktivnim transportom preko serotoninorskog transportera (SERT) (Holz i Fisher 1999, Kolb i Whishaw 2005, Melikian 2004). U presinaptičkom neuronu serotonin se katabolizira ili reciklira (tj. opet ulazi u vezikule). Broj transportera na pojedinom neuronu nije

stalan, nego se mijenja ovisno o aktivnosti sinapse, te tako pridonosi plastičnosti neurona (Melikian 2004).



**Slika 1.3.** Shematski prikaz serotonergične sinapse.

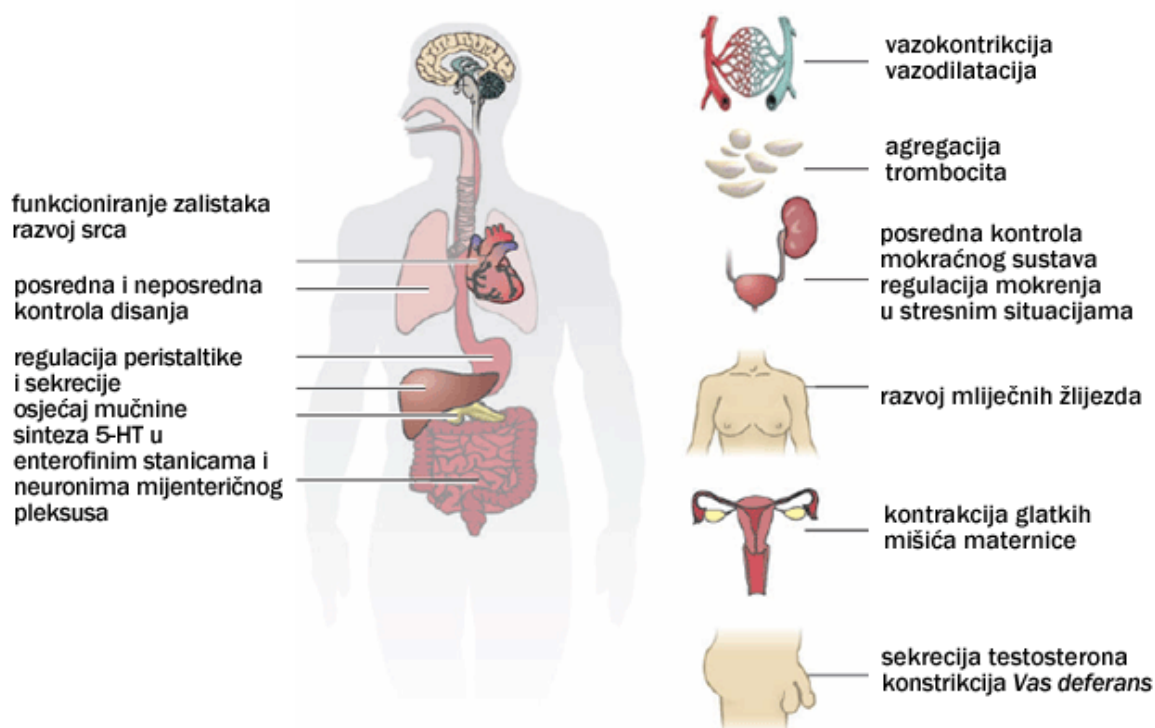
Neki od fizioloških procesa i ponašanja koje regulira serotonin su nociopcija (osjet boli), neuroendokrino izlučivanje, raspoloženje, osjećaj nagrade, stanje budnosti, agresija, anksioznost i strah, procesi učenja, seksualno ponašanje, apetit, i dr. (Frazer i Hensler 1999).

Serotonin se rano pojavljuje u prenatalnom razvoju mozga. Nakon formiranja, serotonergični neuroni šalju aksonske izdanke prema ciljnim neuronima gdje 5-HT služi kao signalna molekula za diferencijaciju i pravilno pozicioniranje neurona unutar kore mozga i hipokampusa, te stvaraju rane sinapse. 5-HT također utječe na neurogenezu, sazrijevanje neurona, grananje dendrita i biosintezu drugih neuromodulatora (npr. tahikinina). Osim što utječu na razvoj ostalih struktura mozga, serotonergični neuroni autoreguliraju i svoj razvoj. Inhibicija rasta i razvoja se vrši

negativnom povratnom spregom direktno preko receptora 5-HT<sub>1B</sub>, a poticanje indirektno preko faktora rasta S- 100 $\beta$  kojeg izlučuju stanice astroglije stimulirane serotoninom. Kod ljudi se serotogenični neuroni pojavljuju u 5. tjednu nakon začeca, a do 15. tjedna se organiziraju u strukturu jezgre rafe. Količina serotonina raste u mozgu do 2.- 5. godine života, a u odrasloj dobi čini 50% najveće koncentracije u djetinjstvu. Sličan razvojni put možemo naći i u mozgu štakora: prvi serotogenični neuroni se pojavljuju 12. dana gestacije, a vrhunac razgranjenja se događa 21. dana nakon okota (Whitaker-Azmitia 2001, 2005, Whitaker-Azmitia et al. 1996).

### 1.2.2. Periferni serotonininski sustav

Serotonin sudjeluje u fiziološkim procesima gotovo svih organskih sustava: krvožilnog, plućnog, gastrointestinalnog i genitourinarnog (Slika 1.4). Preko vaskularnog sustava kontrolira krvni tlak, te ovisno o tipu receptora kojeg aktivira, potiče vazodilataciju ili vazokonstrikciju, te mitozu unutar endotela i sloja glatkih mišića (Berger i sur. 2009, Watts i sur. 2009). Također igra važnu ulogu u aktivaciji trombocita pri zgrušavanju krvi. Trombociti ne mogu sintetizirati serotonin nego 5-HT sintetiziran u enterokromatofinim stanicama i otpušten u krvotok uzimaju i akumuliraju unutar granula. 5-HT ne posreduje različite procese samo preko receptora nego se može i kovalentno vezati unutar trombocita za GTP-aze i stimulirati agregaciju (Berger i sur. 2009, Watts i sur. 2009). 5-HT također koordinira razvoj srca i djelovanje zalistaka u odraslih (Berger i sur. 2009, Côte i sur. 2003 ). Djelovanje serotonina u plućnom sustavu je dvojako: neposredno putem vazokonstrikcije/vazodilatacije pojedinih žila i posredno preko kontrole središta za disanje smještenog unutar leđne moždine (Berger i sur. 2009 ). U gastrointestinalnom sustavu 5-HT modulira pokretljivost tankog crijeva preko mijenteričnog živčanog spleta, sekreciju i osjećaj mučnine (Berger i sur. 2009, Côte i sur. 2003). U muškom genitourinarnom sustavu regulira sekreciju testosterona, krvni protok kroz testise, te potiče kontrakciju *vas deferensa*. Postoje naznake da sudjeluje i u sazrijevanju spermija (Jimenez-Trejo i sur. 2007). Također, pokazano je da serotonin regulira razvoj mliječnih žlijezda putem autokrino-parakrine petlje (Matsuda i sur. 2004)



**Slika 1.4.** Fiziološki procesi koje regulira serotonin (prema Berger i sur. 2009).

### 1.2.3. Povezanost središnjeg i perifernog serotoniniskog sustava

Pri fiziološkom pH, 5-HT je, zbog hidroksilne grupe i dušika koji služi kao akceptor protona, hidrofilna molekula i kao takva ne može proći krvno-moždanu barijeru. Posljedica toga je funkcionalna odijeljenost perifernog i središnjeg serotoniniskog sustava (Lattera i sur. 1999, Whitaker-Azmitia 2001, 2005).

Krvno-moždana barijera je struktura koja odjeljuje SŽS od ostatka tijela i tako mu omogućava normalnu funkciju u uravnoteženom okolišu lišenog ionskih i hormonskih fluktuacija koje se događaju u ostatku tijela. Krvno-moždana barijera je građena od endotelne stanice kapilara u mozgu i nastavaka ("nožica") astrocita. Endotelne stanice kapilara u mozgu tvore čvrsto spojište (eng. *tight junctions*) te time onemogućavaju prolaz tvari između pojedinih stanica, a astrociti predstavljaju mjesto izmjene tvari između krvi i izvanstanične tekućine mozga (Lattera i sur. 1999). Astrociti oblažu oko 80% endotelne stanice moždanih kapilara. Krvno-moždana barijera ipak ne oblaže svu površinu mozga- hipofizu kojoj je potreban kontakt sa krvožilnim sustavom zbog pravilnog funkcioniranja endokrinog izlučivanja, epifizu kojoj je također potrebna regulacija hormona, i donji dio moždanog debla unutar kojeg se nalazi centar za povraćanje.

Mehanizam izmjene tvari preko krvno-moždane barijere je jednostavna difuzija (kojom prelaze male nenabijene molekule topive u mastima, plinovi, itd.) i olakšana difuzija (kojom prolaze molekule poput glukoze, ketona, L-aminokiselina, vitamina, itd.) (Latera i sur. 1999). Budući da tijekom fetalnog i ranog postnatalnog razvoja krvno-moždana barijera nije do kraja razvijena, dva serotoninska odjeljka "komuniciraju" i utječu jedan na drugoga. To razdoblje traje do 2 godine starosti kod ljudi i 20. dana kod štakora. (Whitaker-Azmitia 2001, 2005, Whitaker-Azmitia et al. 1996)

## **1.3. PROMJENE SEROTONINSKE HOMEOSTAZE**

### **1.3.1. Serotonin i poremećaji ponašanja**

Budući da serotonergični neuroni projiciraju u gotovo sva područja mozga, poremećaji homeostaze serotonina sudjeluju u razvoju mnogih bolesti i poremećaja ponašanja. Serotonin usklađuje aktivnosti kao što su cirkadijani ritam, agresija, anksioznost, kognitivne funkcije te modulira druge sustave neurotransmitera kao što su dopaminski i tahikininski (Whitaker-Azmitia i sur. 1996). Uzrok promjene djelovanja serotonina može biti poremećaj u bilo kojem dijelu sinapse - od smetnji u sintezi do pogreške u transportu ili razgradnji. Poopćeno, lučenje serotonina inhibira tj. umanjuje odgovor na okolišne stimulanse, dok smanjena koncentracija serotonina dovodi do pojačanih aktivnosti (Lucki 1998).

Utvrđeno je da serotonin ima ulogu i u cirkadijanom ritmu, tj. kontroliranju ciklusa spavanja i tjelesne temperature (Lucki 1998, Thomas i sur. 2003). Promjene u koncentraciji 5-HT ili u aktivnosti 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2C</sub> ili 5-HT<sub>7</sub> receptora (Frank i sur. 2002, Morrow i sur. 2008, Thomas i sur. 2003) dovode do drugačijeg obrasca spavanja.

Serotonin je dio sustava hranjenja te kontrolira količinu i izbor hrane, te broj obroka (Jimerson i sur. 1990, Lucki 1998). Povećanje koncentracije 5-HT u medijanim jezgrama hipotalamusa dovodi do osjećaja sitosti i prekida hranjenja, a smanjenje do pretjeranog konzumiranja hrane (Lucki 1998). Oboljeli od anoreksije i bulimije također imaju promijenjenu transmisiju serotonina u hipotalamusu (Jimerson i sur. 1990).

Reguliranje nekih primarnih nagona kao što su anksioznost, agresija i impulzivno ponašanje pripada serotoninskom živčanom krugu. Otpuštanje 5-HT-a u amigdali, hipokampusu i prednjem dijelu korteksa posreduje odgovor na stresne situacije i uključuje obrambene mehanizme (npr. u situacijama napada predatora) (Barros Viana i sur. 2008). Isto tako se smatra da serotonin čini



neurobiološku podlogu anksioznih reakcija kao i njihovih poremećaja (Barros Viana i sur. 2008).

Najčešća bolest promjene serotonininske homeostaze je zasigurno depresija (Jimerson i sur. 1990, Lucki 1998, Turner i sur. 2006). Većina simptoma te bolesti je posljedica deficita serotonininske transmisije iako sam razvoj bolesti nije još do kraja razjašnjen (Crawley i sur. 2007, Jimerson i sur. 1990, Lucki 1998). Depresija se liječi inhibitorima SERT-a i MAO, koji povećavaju razinu serotonina u sinaptičkoj pukotini tijekom transmisije, te tako ublažavaju simptome bolesti (Crawley i sur. 2007, Kolb i Whishaw 2005, Turner i sur. 2006).

U Downovom sindromu, neravnoteža u ekspresiji 21. kromosoma, između ostalog utječe i na razvoj serotonergičnih neurona. Morfološke promjene i abnormalne reakcije poput samoozljeđivanja i agresivnih istupa su simptomi izravno povezani s nepravilnim izlučivanjem serotonina (Whitaker-Azmitia 2001).

### 1.3.2. Autizam

Autizam je neurorazvojni sindrom koji obuhvaća spektar simptoma (Crawley 2004, 2007b, Crawley i sur. 2007).

Središnji simptomi bolesti su abnormalna socijalna komunikacija, poremećene komunikacijske vještine i repetitivno ponašanje (Belzung i sur. 2005, Crawley 2004, 2007b, Moy i Nadler 2008). Ostali neurobihevioralni simptomi uključuju nemogućnost prepoznavanja osjećaja, manjak mimike, smanjeno snalaženje u društvenim situacijama, smanjeno emocionalno vezivanje, pretjeranu osjetljivost na taktilne i akustične podražaje te stereotipne pokrete (npr. pljeskanje) (Crawley 2004, Crawley i sur. 2007, Moy i Nadler 2008 ). Učestalost autizma u općoj populaciji je 1 oboljeli na 250- 595 osoba. Bolest se najčešće dijagnosticira u dobi od oko 2 godine života (Crawley i sur. 2007, Moy i Nadler 2008 ).

Uzroci autizma još nisu do kraja razjašnjeni, ali se zna da bolest ima genetičku podlogu (Belzung i sur. 2005, Crawley 2004, Crawley i sur. 2007). Studije nasljeđivanja su pokazale da koincidencija obolijevanja od autizma kod jednojajčanih blizanaca iznosi 60- 90% (Crawley 2007b, Moy i Nadler 2008, Murcia i sur. 2005), kod dvojajčanih blizanaca do 24%, a kod braće i sestara 1- 8% (DiCicco-Bloom i sur. 2007, Murcia i sur. 2005 ). Na genetičku podlogu ukazuje i omjer između spolova jer četiri puta više muškaraca obolijeva od autizma (Crawley 2007b, Crawley i sur. 2007). Uz razvoj autizma povezuje se veći broj gena čime se podupire teorija multigenskog nasljeđivanja (Belzung i sur. 2005, Crawley 2004, 2007b, Crawley i sur. 2007, Moy i Nadler 2008, Murcia i sur. 2005). Nastale promjene ne moraju biti isključivo rezultat mutacija i

oštećenja gena, već i izmijenjenih epigenetičkih procesa (Lord i sur. 2000, Moy i Nadler 2008). Interakcija gena i okolišnih faktora mogla bi pridonijeti tolikoj raznovrsnosti simptoma izraženih u autizmu. Kao neki od mogućih okolišnih uzroka spominju se prenatalno izlaganje nekim kemikalijama kao npr. talidomidu, valproičnoj kiselini, kokainu, alkoholu ili nekim virusnim infekcijama (DiCicco-Bloom i sur. 2007, Whitaker-Azmitia i sur. 1996).

Pretpostavlja se da u autizmu dolazi i do promjena u homeostazi neurotransmitera i hormona. Za sada su rađena istraživanja na poremećajima oksitocina, vazopresina i serotonina (Moy i Nadler 2008, Murcia i sur. 2005, 35 ). Poremećaji u metabolizmu tih spojeva u kombinaciji s mutacijom u nekim drugim genima vjerojatno dovode do oštećenja u razvoju i funkcioniranju mozga, koja su prisutna u autizmu (Moy i Nadler 2008 ).

Nepravilan razvoj mozga i funkcioniranje neurotransmitera je vidljivo i u patološkim promjenama u korteksu, malom mozgu, hipokampusu i amigdali (Crawley i sur. 2007, DiCicco-Bloom i sur. 2007, Lord i sur. 2000), a učestali su i abnormalni nalazi na staničnoj razini (npr. smanjen broj Purkinijevih stanica u malom mozgu) (DiCicco-Bloom i sur. 2007, Lord i sur. 2000). Naravno, navedene promjene dovode i do oslabljenih funkcija tih dijelova mozga i promijenjenih živčanih puteva (DiCicco-Bloom i sur. 2007).

### **1.3.3. Hiperserotoninemija**

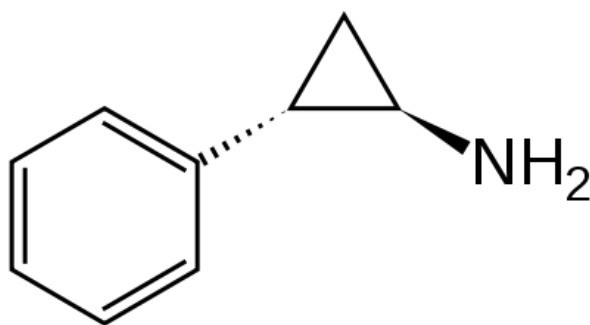
Hiperserotoninemija ili povišena koncentracija 5-HT u krvi, jedan je od najučestalijih fizioloških simptoma autističnog poremećaja koji se javlja u 30-50% oboljelih (Cook, Leventhal 1996, Hranilovic i sur. 2009, McNamara i sur. 2007). S druge strane, kod autističnih osoba uočena je smanjena mogućnost sinteze serotonina u mozgu (Chugani 1999). Dok kod odraslih organizama serotonin ne prelazi krvno- moždanu barijeru (Whitaker-Azmitia 2001, 2005), u mozgu koji se razvija (kod čovjeka do 2. godine, kod štakora do 20. PND) serotonin može slobodno cirkulirati između odjeljaka. Smatra se da bi povišena koncentracija 5-HT koji krvlju s periferije dopijeva u mozak mogla negativnom povratnom spregom inhibirati razvoj terminalnih krajeva serotonergičnih neurona (Anderson et al. 1990, Whitaker-Azmitia 2001), smanjiti sintezu serotonina i tako dovesti do raznih poremećaja u funkcioniranju sustava reguliranih serotoninom, koji se mogu uočiti kod autističnih osoba (Whitaker-Azmitia 2001). Kao mogući uzroci hiperserotoninemije spominju se povećana sinteza ili smanjena razgradnja 5-HT u perifernom odjeljku, promijenjeno otpuštanje iz enterokromafinih stanica, povećani unos u trombocite ili smanjeno otpuštanje iz trombocita (Anderson i sur. 1990, Cook i Leventhal 1996,

Hranilovic i sur. 2009).

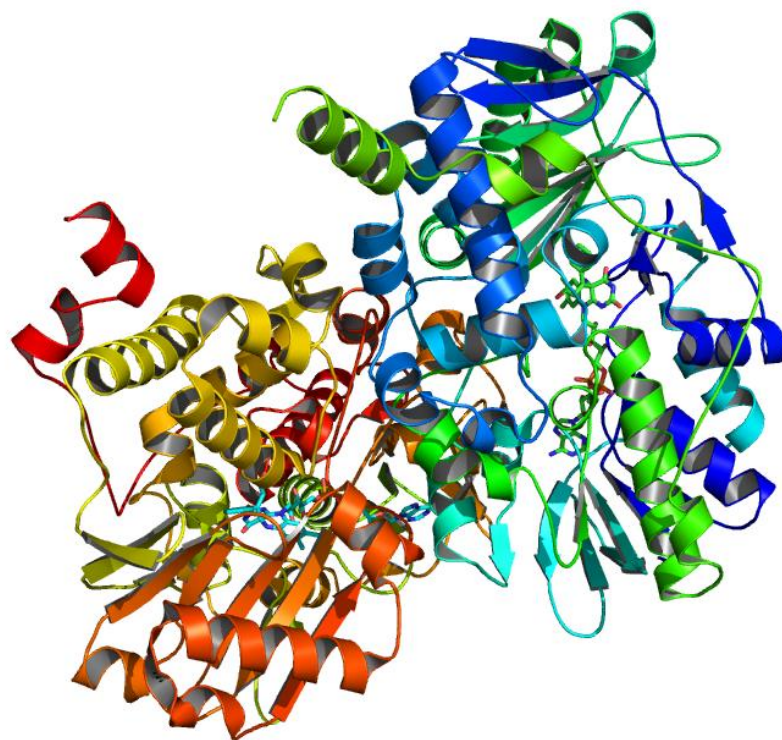
## 1.4. INHIBITORI MONOAMIN OKSIDAZA

Izozimi MAO-A i MAO-B, koji su smješteni na vanjskoj membrani mitohondrija živčanih i perifernih stanica, kataliziraju oksidativnu deaminaciju – nužan korak u katabolizmu egzogenih amina i monoaminskih neurotransmitera, uključujući serotonin (Billett 2004). Iako izozimi imaju različit afinitet za supstrat pri normalnim fiziološkim uvjetima (MAO-A radije oksidira serotonin i norepinefrin, MAO-B radije oksidira feniletilamin, dok tiramin i dopamin predstavljaju supstrate za oba izozima), oba mogu katabolizirati iste spojeve i svaki je u mogućnosti preuzeti funkciju jednog od oblika enzima kojem je funkcija ugušena farmakološkom inhibicijom. U skladu s tim, objavljeni učinci na metabolizam 5-HT kod štakora su bili više naglašeni nakon inhibicije obje izoforme, nego nakon inhibitora samo MAO-A (Celada i Artigas 1993)

Tranilcipromin je ciklopropilamin strukturalno nevezan za hidrazine, a prvi put je sintetiziran 1948. godine kao analog amfetamina (Slika 1.5). Djeluje kao ireverzibilni inhibitor MAO-A i MAO-B koji inhibira oksidaciju 5-HT, noradrenalina i dopamina. Inhibicija tih enzima također dovodi do povišene razine amina u mozgu poput tiramina, triptamina, β-feniletilamina (PEA) i oktopamina, koji se nazivaju aminima u tragovima (engl. *trace amines*) zbog njihove niske koncentracije u mozgu, uspoređujući ju s norepinefrinom, dopaminom i 5-HT (Slika 1.6). Kod štakora, značajni učinci TCP-a na metabolizam 5-HT u mozgu i periferiji su izmjereni kao smanjenje aktivnosti MAO-A, kao povećanje koncentracije 5-HT i kao smanjenje razine 5-HIAA. Gore navedeni učinci su dobiveni u odraslih štakora nakon akutne ili kronične intraperitonealne primjene TCP-a koristeći doze od 0.5 mg/kg do 15 mg/kg. Hiperaktivnost je uočena pri dozama višim od 20 mg/kg, dok je serotoniniski sindrom primijećen tek nakon kombiniranja TCP-a s drugim agonistima 5-HT.



Slika 1.5. Struktura tranilcipromina



**Slika 1.6.** 3d struktura ljudskog MAO-B u kompleksu s tranilciprominom (po strukturi 2XFU s [www.pdb.org](http://www.pdb.org))

## **2. CILJ ISTRAŽIVANJA**

Ovaj rad dio je sveobuhvatnije studije utjecaja povišene koncentracije serotonina u doba perinatalnog razvoja mozga na funkciju serotonina u središnjem odjeljku u odrasloj dobi, na modelu štakora. U tu svrhu štakori su tretirani inhibitorom monoamin oksidaze (MAOI) - tranilciprominom (TCP), u doba intenzivnog razvoja 5- HT neurona: od 13. embrionalnog do 21. postnatalnog dana.

Cilj ovog diplomskog rada bio je utvrditi postoje li promjene u emocionalnom, socijalnom i kognitivnom ponašanju odraslih štakora perinatalno tretiranih s 2 mg/kg TCP-a, u odnosu na kontrolnu skupinu štakora tretiranu fiziološkom otopinom.

Razina lokomotorne aktivnosti i reakcija na opetovani zvučni podražaj testirane su u otvorenom polju (eng. *open field*), stupanj anksioznosti i eksploratorno ponašanje na ploči s rupama (eng. *hole board*), socijalna anksioznost ispitivana je pomoću testa socijalnog izbora (eng. *social choice*), a sposobnost učenja i kognitivna rigidnost u T- labirintu (eng. *T- maze*). Pretpostavili smo da bi značajna odstupanja u nekom od navedenih ponašanja mogla ukazivati na trajne poremećaje u serotonergičnoj transmisiji u štakora perinatalno tretiranih TCP-om.

### **3. MATERIJALI I METODE**

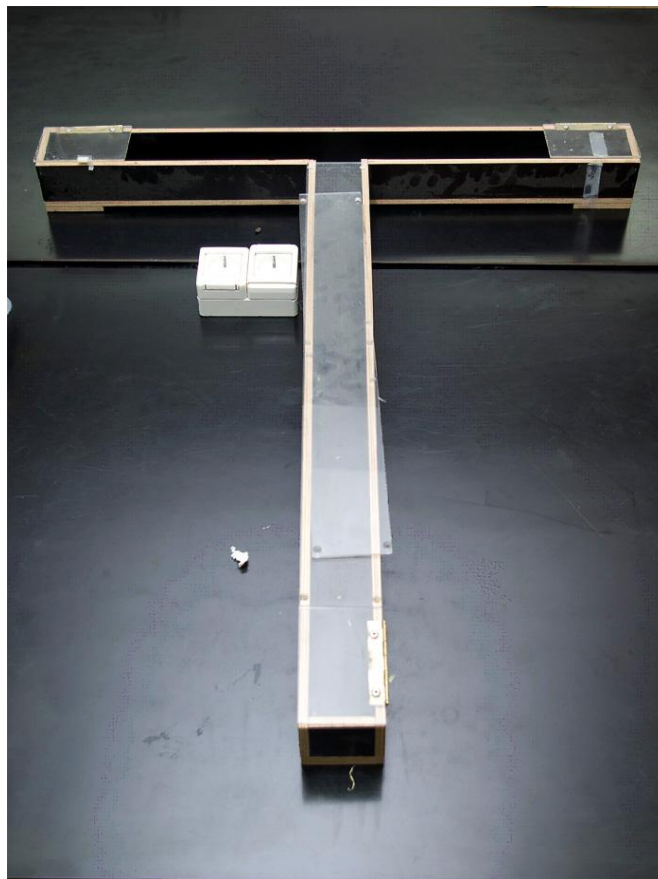
## 3.1. MATERIJALI

### 3.1.1. Životinje

U istraživanju je korišteno 43 štakora soja Wistar. 16 štakora (8 mužjaka i 8 ženki) je perinatalno tretirano s 2 mg/kg TCP-a, a 27 štakora (13 mužjaka i 14 ženki) s fiziološkom otopinom (jednakim volumenom, u istom periodu i na isti način). 3-5 jedinki štakora istog spola je bilo smješteno u kavezima, uz slobodan pristup hrani i vodi (osim u razdoblju kognitivnog testiranja), u prostoriji kontrolirane temperature ( $22 \pm 2^\circ \text{C}$ ) i svjetlosnim ciklusima od po 12h (svjetlo se palilo u 09.00h, a gasilo u 21h).

### 3.1.2. Aparatura

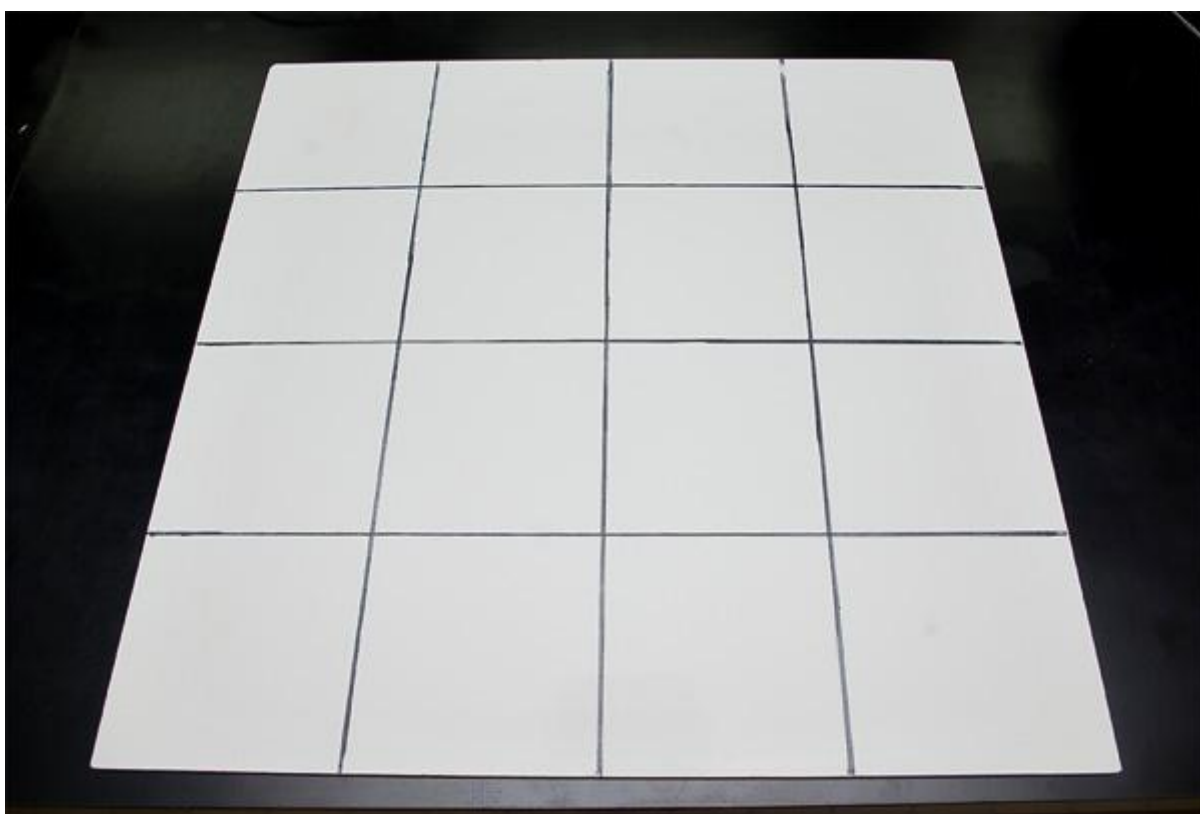
- ◆ T- labirint (Slika 3.1) je jednostavan labirint oblika slova T, napravljen od drva obojanog crnom bojom. Veličina središnjeg kraka je 85cm x 7,8cm x 6cm, a postranih krakova 37cm x 7,8cm x 6cm. Na kraju oba kraka je bio označen dio (dugačak 10cm) u koji se stavljala hrana.



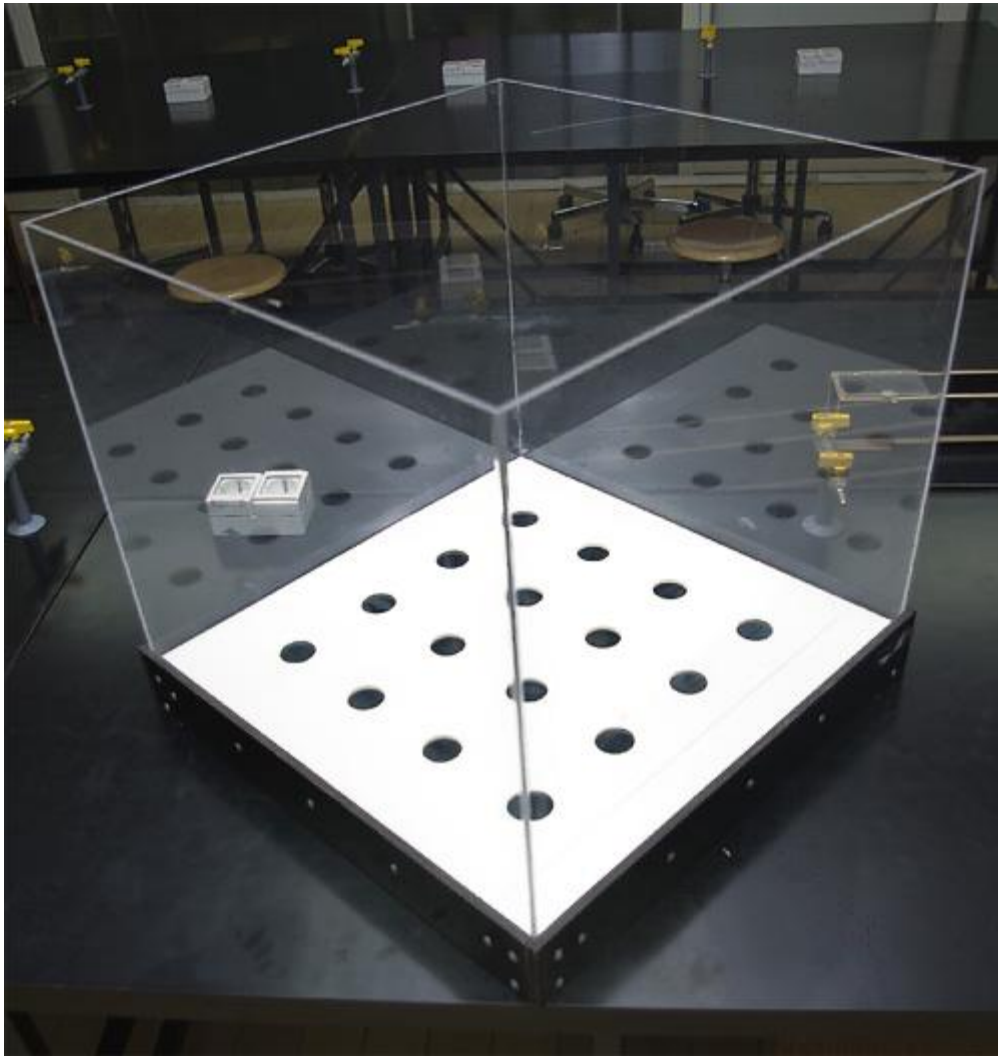
**Slika 3.1.** T- labirint



- ◆ Aparat otvoreno polje (Slika 3.2) je prozirna kutija od pleksiglasa veličine 56cm x 56cm x 44cm s drvenom pločom na dnu na kojoj su označena 4x 4 polja veličine 13,8cm x 13,8cm.
- ◆ Ploča s rupama (Slika 3.3) je prozirna kutija, napravljena od pleksiglasa veličine 56cm x 56cm x 44cm. Na dnu se nalazi ploča sa 16 ravnomjerno postavljenih rupa (4x 4) promjera 3,8cm. Rupe su bile fiktivno podijeljene na rubne (12 rupa uz stijenke kutije) i centralne (4 rupe u središnjem dijelu aparature).



**Slika 3.2.** Aparat otvoreno polje



**Slika 3.3.** Aparat ploča s rupama

- ◆ Testni kavez za socijalni izbor (Slika 3.4) je sastavljen od tri međusobno spojena dijela. Dva postrana dijela, dimenzija 41,5cm x 21,5cm x 30cm, sadrže žičani odjeljak u koji se može smjestiti živi ili neživi objekt namijenjen istraživanju. Žičana pregrada dopušta vizualno, auditorno, olfaktorno i ograničeno taktilno istraživanje inicirano od strane testiranog štakora (Crawley 2004, 2007b). Središnji dio u koji se stavlja testirani štakor je također veličine 41,5cm x 21,5cm x 30cm.



**Slika 3.4.** Kavez za test socijalni izbor

## 3.2. TESTOVI PONAŠANJA

Obje skupine štakora su bile podvrgnute bateriji testova istim redoslijedom: učenje i kognitivna rigidnost, lokomotorna aktivnost, anksioznost i eksploratorno ponašanje, socijalni izbor i reakcija na opetovano izlaganje uznemirujućem zvučnom podražaju.

Svi testovi su se izvodili u periodu između 12h i 18h u sobi sa stalnom temperaturom i umjerenim osvjetljenjem. Ponašanja su bilježila dva neovisna promatrača te su na kraju izračunate srednje vrijednosti njihovih rezultata. Nakon svakog testiranog štakora aparatura je oprana antiseptikom i vodom.

### 3.2.1. Učenje i kognitivna rigidnost

Učenje i kognitivna rigidnost ispitivani su u T- labirintu. Test je podijeljen u dva dijela: učenje, u kojem štakor nauči u kojem se kraku nalazi nagrada (kondenzirano mlijeko) i obrat pri kojem životinja treba naučiti da se nagrada nalazi u suprotnom kraku (Crawley 2004, 2007b). 24h prije testiranja štakore smo lišili hrane, tako da budu motivirani za učenje (Schwartz i Borta 2005). Tijekom vremenskog perioda u kojem se provodilo testiranje štakori su imali pristup hrani jedan sat dnevno. Prvi pokušaj smo nazvali "nulti", njime smo odredili prirodni odabir štakora jedne

strane te smo u sljedećim pokušajima nagradu stavljali na suprotnu stranu. Test se izvodio jedan put dnevno, a sastojao se od 10 pokušaja u trajanju od 60 sec. Štakori su usvojili prostornu poziciju hrane u trenutku kada su od 10 pokušaja imali 8 točnih (Crawley 2004, 2007b). Točan odabir se računao kada bi štakor prešao s dvije prednje šape u krajnji dio kraka i kušao hranu. Neuspjeli pokušaj se bilježio kada bi štakor otišao na suprotni krak, a postojala je i kategorija izostanka kada štakor ne bi došao niti do jednog kraja labirinta. Nakon naučenog položaja, mijenjala se pozicija hrane te je slijedila inverzija učenja. Novi položaj se smatrao usvojenim u trenutku kada je ostvareno 8/10 uspješnih pokušaja. Bilježio se broj pokušaja potrebnih da se usvoji početna pozicija hrane te broj pokušaja za inverznu poziciju hrane. Između pokušaja istog štakora T- labirint se brisao vlažnim maramicama.

### **3.2.2. Lokomotorna aktivnost**

Lokomotorna aktivnost se istraživala u otvorenom polju, a obuhvaćala je horizontalnu aktivnost (mjerenu kao broj prelazaka između označenih polja) i vertikalnu aktivnost (mjerenu kao broj propinjanja). Svaki štakor je stavljen u donji desni kut i njegovo ponašanje se bilježilo tijekom 5 minuta. Prelazak u novo polje bilježio se kada bi štakor s obje prednje šape prešao istu crtu, a propinjanje kada prednje šape ne dodiruju podnu ploču, a tijelo je uspravno. Broj prelazaka i propinjanja se određivao ručnim hemocitometrima.

### **3.2.3. Anksioznost i eksploratorno ponašanje**

Anksioznost i eksploratorna aktivnost su određivane na ploči s rupama u koje su štakori gurali njuške. Ukupan broj istraženih rupa odražavao je eksploratornu aktivnost, a omjer broja posjećenih unutarnjih i vanjskih rupa razinu anksioznosti. "Ubod" se bilježio kada je štakor uronio do iznad razine očiju u rupu. Svaki štakor je postavljen na sredinu ploče s rupama te se tijekom 5 min. bilježio broj uboda te položaj istraženih rupa.

### **3.2.4. Socijalni izbor**

Test socijalni izbor podijeljen je u tri dijela: 1. period habituacije, 2. period izbora između istraživanja neživog predmeta i štakora i 3. period izbora između već istražene i nove jedinke štakora.

Prvih 5 min štakor se stavio u kavez na habituaciju, a bilježila se latencija do prvog prelaska u drugi kavez, broj prelazaka i broj propinjanja. Prelazak se bilježio kad je štakor s obje prednje

noge prešao u susjedni odjeljak kaveza za testiranje. Navedeni parametri pokazivali su lokomotornu aktivnost i razinu anksioznosti ispitivane životinje. Nakon perioda habituacije u jedan postrani odjeljak se stavio štakor s kojim testirani štakor nije ranije imao kontakta, a u drugi postrani odjeljak nepoznati predmet (crvena bočica). Tijekom 10 min se mjerila latencija do prvog kontakta s predmetom ili štakorom te vrijeme provedeno istažujući predmet ili štakora. U zadnjem dijelu testa se predmet zamijenio s drugim nepoznatim štakorom te su se izmjerile iste aktivnosti kao i u drugom dijelu pokusa (Crawley 2004, Crawley i sur. 2007). Štakori koji su korišteni kao objekti istraživanja su bili istog spola kao i testni štakori te su prije pokusa na 10 min bili navikavani na boravak u žičanom odjeljku kako ne bi remetili tijekom pokusa (Crawley i sur. 2007). Parametri su se mjerili ručnim hemocitometrima i zapornim satovima.

### 3.2.5. Reakcija na uznemirujući zvučni podražaj

Reakcija na uznemirujući zvučni podražaj je ispitivana u aparatu otvoreno polje. Njime smo ispitali odgovor životinja na opetovani glasni zvuk visoke frekvencije. Zvuk smo proizveli puhanjem u pištaljku za pse koja ima raspon 18- 22 kHz, u trajanju od 3s, što odgovara frekvenciji i trajanju prirodnog alarmnog glasanja štakora (ono traje 300- 2000 ms) (Wöhr i sur. 2005).

Pokus se sastojao od dva dijela. U prvom dijelu smo stavili životinju u otvoreno polje na 5 minutnu habituaciju, tijekom koje su se čuli samo bijeli šumovi (Kahne i sur. 2002). Bilježili su se prelasci, propinjanja i latencija do prvog prelaska kako bi se ustvrdila normalna pokretljivost i razina anksioznosti životinje. Tijekom drugog dijela pokusa smo zvučno stimulirali životinju 10 puta tijekom 5 min u pravilnim razmacima i bilježili broj reakcija smrzavanja (engl. *freezing*), kojom štakori reagiraju na opasnost.

## 3.3. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Podatke smo analizirali u programu GraphPad InStat 3.01. Za određivanje pravilnosti distribucije upotrijebili smo Kolmogorov–Smirnov test. Parametre koji su imali pravilnu distribuciju smo usporedili Studentovim t-testom, a one koji nisu neparametrijskim Mann-Whitney U testom. U testu učenje i kognitivna rigidnost smo upotrijebili Friedmanov test uz Dunnovu post-hoc analizu.

U tabličnom prikazu koristila se srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija ( $M \pm SD$ ), a u grafičkom srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška ( $M \pm SEM$ ). Značajnost rezultata je

prihvaćena kod  $p < 0,05$ . U rezultatima nekih pokusa smo isključili jedinke čiji su rezultati odstupali od prosječne vrijednosti više od dvije standardne devijacije.

## **4. REZULTATI**

## 4.1. UČENJE I KOGNITIVNA RIGIDNOST

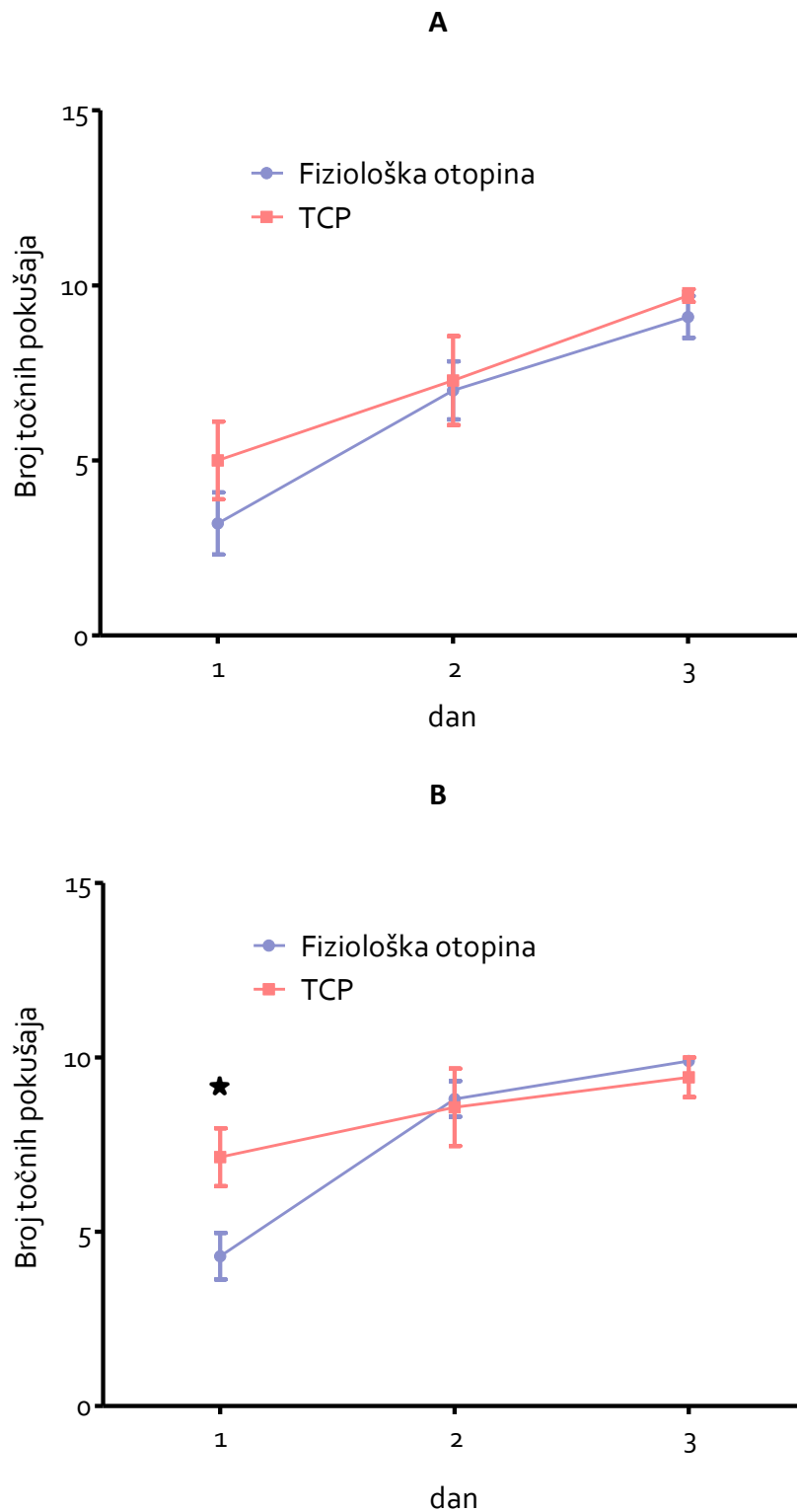
Učenje i kognitivna rigidnost ispitivani su u T- labirintu (Tablica 4.1.). Prvi dio testa odnosio se na vrijeme potrebno da štakori nauče u kojem kraku T- labirinta se nalazi nagrada. Broj točnih pokušaja u obje skupine se povećavao s vremenom, što je vidljivo u porastu točnih pokušaja u odnosu na dane. U procesu učenja nije pronađena značajna razlika između eksperimentalne i kontrolne skupine (Slika 4.1.a). U drugom dijelu testa štakori su trebali naučiti da se nagrada nalazi u suprotnom kraku. I ovdje se s vremenom povećavao broj točnih pokušaja u obje skupine, a kod eksperimentalne skupine je uočen značajno veći broj točnih pokušaja tijekom prvog dana ( $U'=57,50$ ,  $p= 0,0315$ ) (Slika 4.1.b).

**Tablica 4.1.** Točan broj pokušaja pronalaska nagrade u T labirintu

Dani učenja	Tretman	
	Fiziološka otopina (N= 10 )	TCP (N= 7 )
1.	$3,2 \pm 2,82$	$5,0 \pm 2,94$
2.	$7,0 \pm 2,63$	$7,28 \pm 3,35$
3.	$9,1 \pm 1,91$	$9,71 \pm 0,49$
Dani inverzije		
1.	$4,3 \pm 2,11$	$7,14 \pm 2,19 *$
2.	$8,8 \pm 1,62$	$8,57 \pm 2,94$
3.	$9,9 \pm 0,32$	$9,43 \pm 1,51$

M  $\pm$  SD; \*  $p < 0,05$  Mann- Whitney test





**Slika 4.1.** A) Dinamika učenja položaja nagrade u T-labirintu štakora tretiranih fiziološkom otopinom (N= 10) i TCP-om (N=7). Rezultati su prikazani kao  $M \pm SEM$ ; B) Dinamika učenja inverznog položaja nagrade u T-labirintu štakora tretiranih fiziološkom otopinom (N=10) i TCP-om (N=7). Rezultati su prikazani kao  $M \pm SEM$ . \*  $p < 0,05$ , Mann-Whitney test

## 4.2. LOKOMOTORNA AKTIVNOST

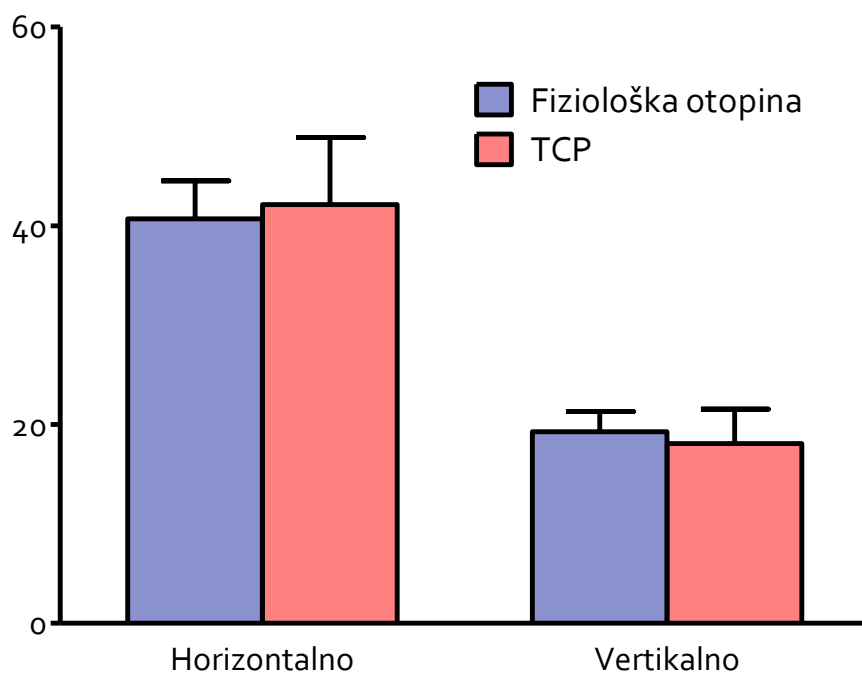
Lokomotorna aktivnost štakora mjerena je u otvorenom polju tijekom 5 min, pri čemu se bilježila horizontalna i vertikalna aktivnost (Tablica 4.2.).

Nije uočena značajna razlika u horizontalnoj aktivnosti između skupina ( $t= 0,198$ ;  $df= 41$ ;  $p= 0,844$  (Slika 4.2.)), a ni vertikalna aktivnost se nije značajno razlikovala između skupina ( $t=0,382$ ;  $df= 41$ ,  $p=0,752$ )

**Tablica 4.2.** Parametri lokomotorne aktivnosti štakora

	Tretman	
	Fiziološka otopina (N= 27)	TCP (N= 16)
Broj prelazaka	40,70 ± 19,91	42,13 ± 27,03
Broj propinjanja	19,26 ± 10,61	18,06 ± 13,91

M ± SD



**Slika 4.2.** Horizontalna lokomotorna aktivnost (mjerena kao broj prelazaka u susjedno polje) i vertikalna lokomotorna aktivnost (mjerena kao broj propinjanja) štakora tretiranih fiziološkom otopinom (N=27) i TCP-om (N=16). Rezultati su prikazani kao M ± SEM.

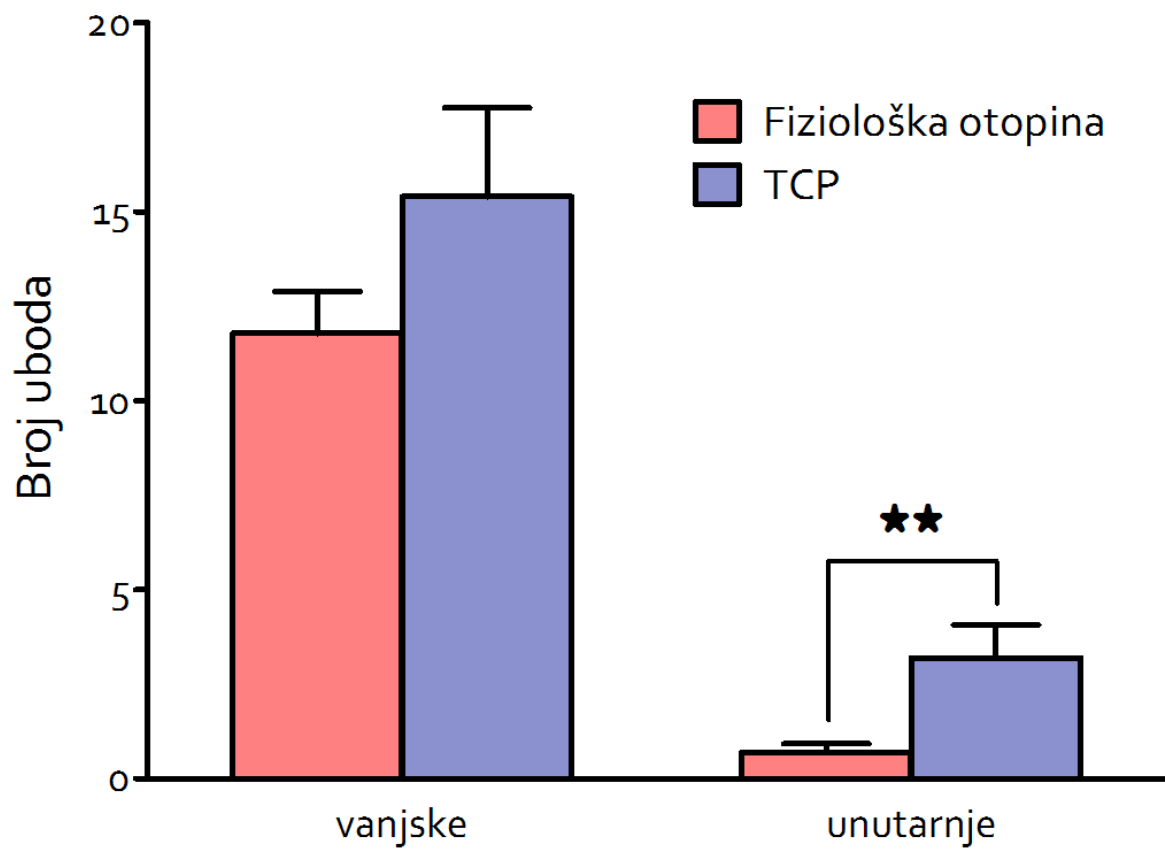
### 4.3. ANKSIOZNOST I EKSPLORATORNO PONAŠANJE

Anksioznost i eksploratorna aktivnost mjerene su tijekom 5 minuta na ploči s rupama (Tablica 4.3.). Štakori tretirani TCP-om posjetili su indikativno veći broj vanjskih rupa i značajno veći broj unutarnjih rupa ( $U'=336,00$ ,  $p=0,0026$ ) nego štakori tretirani fiziološkom otopinom (Slika 4.3), što ukazuje na povećano eksploratorno ponašanje. Značajno veća vrijednost omjera posjećivanja unutarnjih i vanjskih rupa kod štakora tretiranih TCP-om ( $U'=290,00$ , ) ukazuje na smanjenu anksioznost štakora iz eksperimentalne skupine u odnosu na kontrolne štakore (Slika 4.4.).

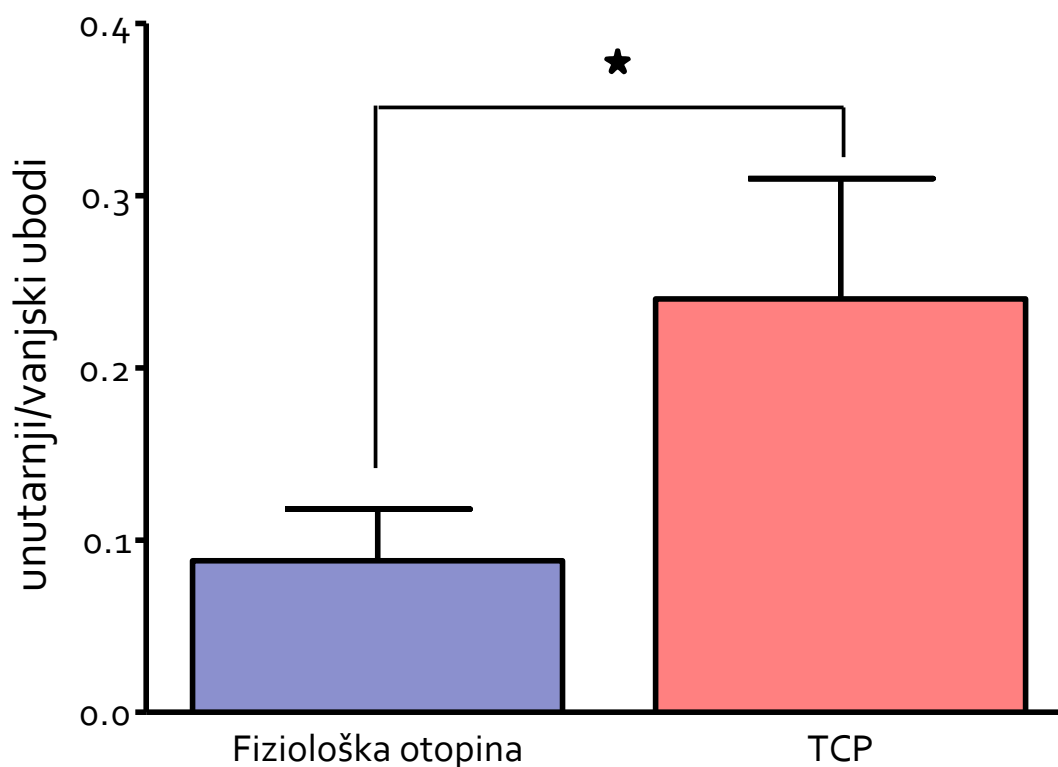
**Tablica 4.3.** Parametri anksioznosti i eksploratornog ponašanja

	Grupa	
	Fiziološka otopina (N= 27)	TCP (N= 15)
Broj vanjskih uboda	11,78± 5,74	15,4± 9,126
Broj unutarnjih uboda	0,71± 1,20	3,19± 3,53 **
Omjer unutarnjih i vanjskih uboda	0,08± 0,17	0,24± 0,27 #

M ± SD; \*\*  $p < 0,01$  ; #  $p < 0,05$ , Mann- Whitney test



**Slika 4.3.** Stupanj eksploratornog ponašanja štakora tretiranih fiziološkom otopinom (N= 27) i TCP-om (N= 15), izmjeren kao broj ubadanja njuške u untarnje i vanjske rupe. Rezultati su pokazani kao  $M \pm SEM$ . \*\*  $p < 0,01$ , Mann-Whitney test



**Slika 4.4.** Stupanj anksioznosti štakora tretiranih fiziološkom otopinom (N= 27) i TCP-om (N= 15), izmjeren kao omjer ubadanja njuške u untarnje i vanjske rupe. Rezultati su pokazani kao  $M \pm SEM$ . \*  $p < 0,05$ , Mann-Whitney test

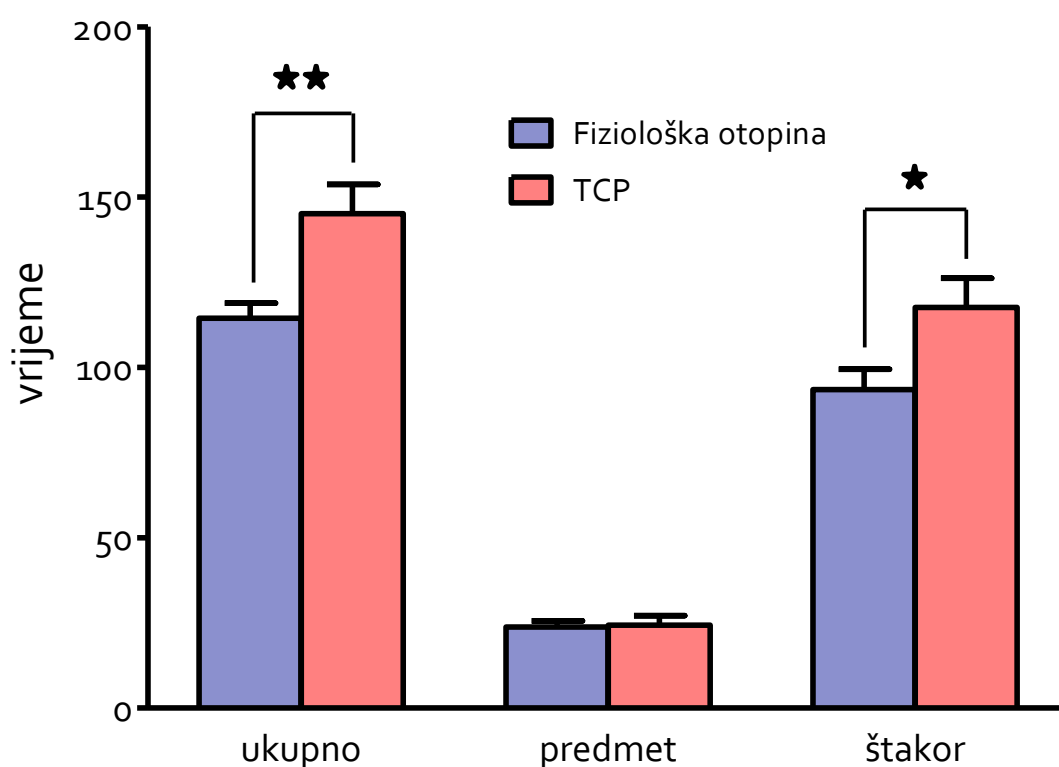
#### 4.4. SOCIJALNI IZBOR

Socijalno ponašanje štakora mjereno je testom socijalnog izbora (Tablica 4.4). U prvom dijelu eksperimenta štakor je mogao birati između neživog objekta i živog, nepoznatog štakora. Životinje iz skupine tretirane TCP-om provodile su ukupno više vremena u istraživanju ( $t = 3,553$ ,  $df = 41$ ,  $p = 0,0014$ ), što opet ukazuje na povećanu eksploratornu aktivnost (Slika 4.5). Skupine se nisu razlikovale u vremenu provedenom u istraživanju neživog objekta, ali su štakori tretirani TCP-om značajno više vremena provodili u istraživanju živog objekta ( $t = 2,373$ ,  $df = 41$ ,  $p = 0,0224$ ), što ukazuje na smanjenu socijalnu anksioznost. U drugom dijelu pokusa - izboru između neistraženog i istraženog štakora, skupine se nisu značajno razlikovale niti u jednom mjerenom parametru, iako je skupina tretirana TCP-om ponovo pokazala tendenciju ka povećanoj eksploratornosti i smanjenoj anksioznosti (Slika 4.6).

**Tablica 4.4.** Parametri socijalnog ponašanja štakora

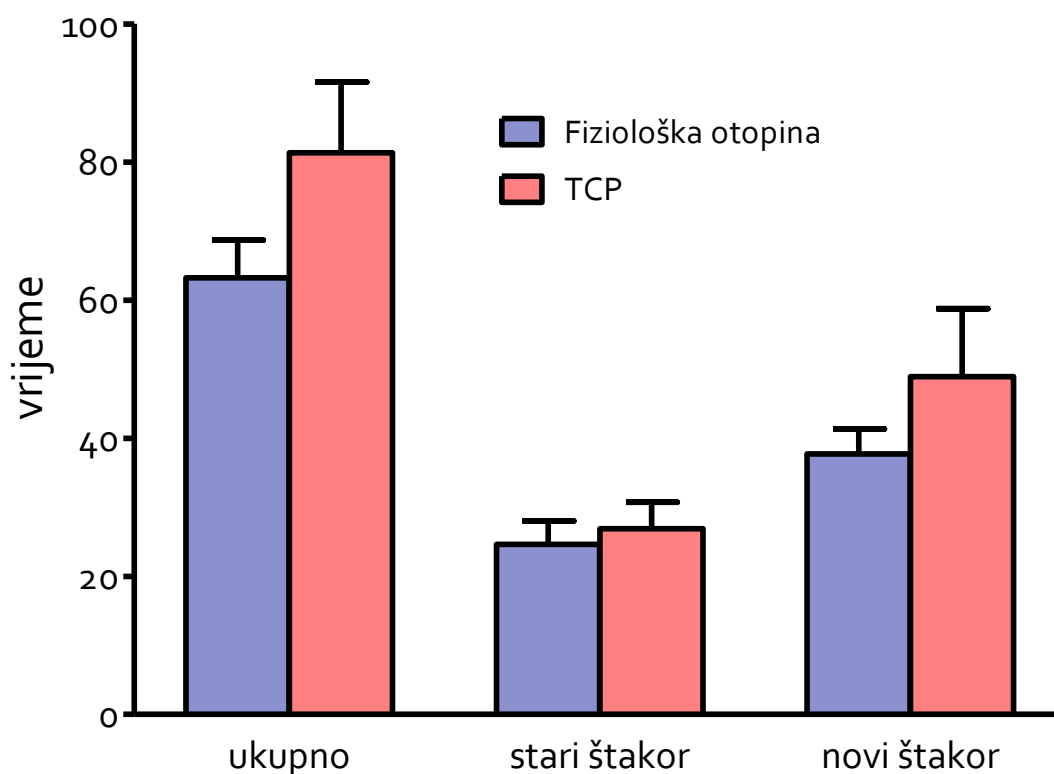
	Tretman	
	Fiziološka otopina (N= 27)	TCP (N= 16)
Vrijeme provedeno sa Š	93,48 ± 31,06	117,63 ± 34,20 *
Vrijeme provedeno s P	23, 82 ± 9,17	24,31 ± 11,14
Vrijeme provedeno sa Š i P	114,42 ± 23,80	145,13 ± 33,12 **
Vrijeme provedeno sa Š1	24,61 ± 17,22	26,87 ± 14,99
Vrijeme provedeno sa Š2	37,73 ± 18,33	48,93 ± 38,01
Vrijeme provedeno sa Š1 i Š2	63,25 ± 27,94	81,31 ± 41,02

M ± SD; \* p < 0,05, Studentov t- test; p < 0,01, Studentov t- test; Š – štakor, P – predmet, Š1 – istražena jedinka štakora, Š2 – nova jedinka štakora



**Slika 4.5.** Socijalna anksioznost štakora tretiranih fiziološkom otopinom (N = 27) i TCP-om (N = 16), mjerena kao vrijeme provedeno u istraživanju živog ili neživog objekta te kao ukupno

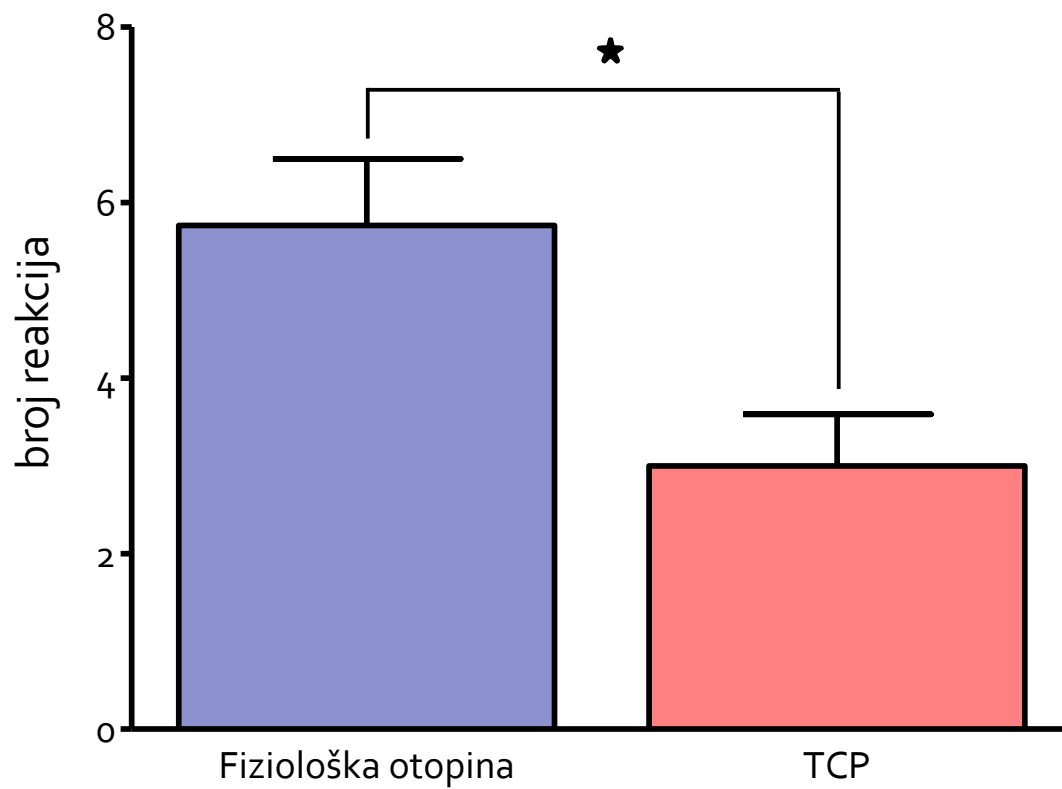
vrijeme provedeno u istraživanju. Rezultati su prikazani kao  $M \pm SEM$ . \*  $p < 0,05$ , Studentov t-test \*\*  $p < 0,01$ , Studentov t-test



**Slika 4.6.** Socijalna anksioznost štakora tretiranih fiziološkom otopinom ( $N = 27$ ) i TCP-om ( $N = 16$ ), mjerena kao vrijeme provedeno u istraživanju starog ili novog štakora te ukupnog vremena provedenog u istraživanju štakora. Rezultati su prikazani kao  $M \pm SEM$ .

#### 4.5. REAKCIJA NA OPETOVANI ZVUČNI PODRAŽAJ

Na zvučni podražaj, koji označava opasnost, obje skupine štakora reagirale su smrzavanjem (engl. *freezing*). Broj navedenih reakcija tijekom 10 zvučnih signala označavao je stupanj anksioznosti, a bio je značajno manji kod eksperimentalne ( $3,00 \pm 2,39$ ) nego kod kontrolne ( $5,74 \pm 3,62$ ) skupine ( $U'=266,00$ ,  $p= 0.0199$ ) (Slika 4.7).



**Slika 4.7.** Broj reakcija nakon uznemirujućeg zvučnog podražaja kod štakora tretiranih fiziološkom otopinom (N = 23) i TCP-om (N = 16). Rezultati su prikazani kao  $M \pm SEM$ . \*  $p < 0,05$ , Studentov t-test



## **5. RASPRAVA**

Perinatalnim tretmanom inhibitorom monoamin oksidaze, tranilciprominom, htjeli smo inducirati hiperserotoninemiju inhibicijom katabolizma 5-HT tijekom najintenzivnije faze razvoja serotonergičnih neurona (od 13. gestacijskog dana do 21 postnatalnog dana). Tijekom tog razdoblja krvno-moždana barijera još uvijek nije do kraja formirana, pa serotoninski odjeljci nisu u potpunosti razdvojeni, te je moguć prelazak serotonina iz jednog odjeljka u drugi. Budući da je pokazano kako periferna primjena TCP-a inhibira MAO i u periferiji i u mozgu, teško je razlikovati izravne učinke TCP-a na mozak i indirektne učinke TCP-a zbog hiperserotonimije. U svakom slučaju, mozgovi štakora korištenih kao eksperimentalna grupa u pokusu bili su izloženi povišenim razinama 5-HT tijekom razvoja. Za potrebe ovog istraživanja, doza TCP-a koju smo koristili je bila 2 mg/kg, za koju se, prema literaturnim podacima, očekivalo da će uspješno blokirati većinu degradacije 5-HT.

Cilj istraživanja je bio vidjeti je li izloženost povišenim koncentracijama serotonina tijekom perinatalnog razvoja ostavila posljedice u kognitivnom, emocionalnom i socijalnom ponašanju odraslih jedinki, što bi ukazivalo na trajne promjene u središnjem odjeljku 5-HT. Naime, odabrali smo aspekte ponašanja koji su regulirani serotoninom ili koji predstavljaju endofenotipove autizma. Endofenotip je mjerljivi simptom nekog poremećaja koji se može proučavati na animalnom modelu te predstavlja odlično oruđe za istraživanje biološke podloge različitih poremećaja ponašanja (Gould i Gottesman 2006).

Testom učenje i kognitivna rigidnost smo ispitivali opće kognitivne sposobnosti štakora kao i moguće stereotipno ponašanje tj. nemogućnost obrata naučenog (Crawley i sur. 2007, Tanimura i sur. 2008). Iako do sada nije pronađena izravna veza između poremećaja serotoninskog sustava i promjena u kognitivnim funkcijama, Crawley (2004, 2007) navodi kognitivnu rigidnost kao jedan od glavnih simptoma autizma. Cilj testa je bio utvrditi koliko brzo štakor nauči početni položaj nagrade, te hoće li i koliko brzo usvojiti promijenjeno mjesto nagrade. Jedina značajna razlika između skupina je pronađena tijekom prvog dana inverzije, dok tijekom ostalih dana nije pronađena nikakva značajna razlika. Takvi rezultati su pomalo iznenađujući s obzirom na to da nije bilo stereotipnog ponašanja nemogućnosti obrata naučenog; štoviše, grupa tretirana TCP-om brže je naučila novu lokaciju nagrade.

Testom lokomotorne aktivnosti se ispituje opća aktivnost štakora, kao i nepravilnosti poput hiperaktivnosti ili slabe pokretljivosti (Barros Viana i sur. 2008, Crawley 2007a, Pandaranandakaa i sur. 2009). Budući da većina testova uključuje kretanje štakora kroz neki prostor, testirali smo njihovu opću pokretljivost i aktivnost. To smo učinili kako bismo mogli utvrditi jesu li dobiveni rezultati u drugim testovima posljedica izmijenjenog ponašanja ili izmijenjene pokretljivosti štakora. Dobiveni rezultati pokazuju da nema razlike između kontrolne skupine i skupine tretirane TCP-om.

Usmjereno eksploratorno ponašanje te razinu anksioznosti štakora u nepoznatom okolišu smo testirali na ploči s rupama (Brown i Nemes 2008, Moy i sur. 2008). Grupa tretirana TCP-om je istražila značajno veći ukupni broj rupa te značajno veći broj unutarnjih rupa od kontrolne skupine, što je najvjerojatnije posljedica smanjene anksioznosti i povećanog eksploratornog ponašanja. Također, omjer broja unutarnjih i vanjskih rupa koje su štakori istražili ukazuje na značajano smanjenje anksioznosti kod štakora tretiranih TCP-om. Unutarnje rupe štakorima predstavljaju otvoreni, nezaštićeni prostor, pa boravak u njemu inducira stres (Brown i Nemes 2008). Anksiozniji štakori izbjegavaju otvorene prostore (tzv. tigmotaksija), te sukladno tome i manje posjećuju unutarnje rupe.

Pokus socijalni izbor testira odabir socijalne interakcije nad istraživanjem neživog objekta te preferenciju za nove jedinke nad već poznatima (Belzung i sur. 2005, Crawley 2004, 2007b). Štakori tretirani TCP-om su općenito proveli više vremena u istraživanju. Također, to se povećano istraživanje odnosilo na štakora, a ne na objekt, što je i dovelo do značajno većeg omjera provedenog vremena sa štakorom naspram predmeta, nego kod kontrolnih štakora. To ukazuje na povećani interes za socijalnim kontaktom. U drugom dijelu pokusa se istraživala želja za novim socijalnim kontaktom nasuprot onim s već poznatim štakorom (Crawley 2004, 2007b). U tom dijelu nismo uočili statističke značajne razlike iako je omjer vremena provedenog s novim štakorom i vremena provedenog s već istraženim štakorom opet bio veći u eksperimentalnoj, nego u kontrolnoj skupini.

Testiranjem reakcije na stresni zvučni podražaj također smo pokušali utvrditi razinu anksioznosti. Štakori imaju dobro razvijen sluh i koriste ultrazvuk kao sredstvo komunikacije.

Unutar tog raspona, određena frekvencija i trajanje (ovisno o dobi štakora) prenose različite poruke (Brudzynski 2001, Ricceri i sur. 2007, Wöhr i sur. 2005). Za zvučni podražaj smo izabrali frekvenciju između 18- 32 kHz jer njome štakori upozoravaju druge štakore na prisutnost opasnosti ili neugodnih podražaja. Ta frekvencija inducira urođena obrambena ponašanja, kao što su smrzavanje (engl. *freezing*) ili bježanje (Brudzynski 2001, Nicolas i sur. 2007, Wöhr i sur. 2005). Uočili smo značajnu razliku između skupina u pokazivanju reakcije smrzavanja: štakori tretirani TCP-om značajno su manje pokazivali reakciju smrzavanja od kontrolne skupine što ukazuje ili na nejednaku sposobnost percepcije zvuka ili na smanjenu anksioznost eksperimentalne grupe. Naime, promjene u serotoninском sustavu, osim na razinu anksioznosti, utječu i na procesiranje zvuka u odrasloj dobi (Kahne i sur. 2002), a hiperosjetljivost na zvučne podražaje je jedan od popratnih endofenotipova autizma (Crawley 2004, 2007).

U štakora tretiranih TCP-om utvrđena je smanjena razina anksioznosti, povećana želja za socijalnim kontaktom i povećano eksploratorno ponašanje. Ovakvo ponašanje, premda se ne uklapa u autistični endofenotip, odgovara ponašanju štakora nakon akutnog tretmana lijekovima koji smanjuju razinu serotonergične transmisije (Borsini i sur. 2002; Kshama i sur. 1990). S obzirom da su, kasnije provedena, neurokemijska mjerenja pokazala povećanu razgradnju te smanjenu sintezu i koncentraciju serotonina u mozgu štakora tretiranih TCP-om, možemo pretpostaviti da je opaženo ponašanje rezultat smanjene serotoninske funkcije nastale kao kompenzacija povišenim koncentracijama serotonina u mozgu tijekom tretmana. Druga mogućnost je da je opaženo ponašanje rezultat pojačane dopaminergične aktivnosti. Dopamin je osnovni regulator motivacije za djelovanje prema okolini, a TCP je tijekom tretmana inhibirao i njegovu razgradnju te je mogao uzrokovati i trajne kompenzatorne promjene u dopaminergičnoj transmisiji.

## **6. ZAKLJUČAK**

1. 16 štakora perinatalno tretiranih s 2 mg/kg TCP-a i 27 štakora perinatalno tretiranih fiziološkom otopinom podvrgnuto je u odrasloj dobi bateriji testova koji ispituju kognitivno, emotivno i socijalno ponašanje.
2. Skupina štakora tretiranih TCP-om je, u odnosu na skupinu kontrolnih štakora, pokazala smanjenu razinu anksioznosti i kognitivne rigidnosti te povećanu razinu eksploratornog ponašanja i socijabilnosti, dok se razina lokomotornog gibanja nije razlikovala.
3. Opažene promjene u ponašanju ukazuju na smanjenje serotoninske funkcije u središnjem odjeljku, nastale kao trajna posljedica izloženosti mozga štakora povišenim konc. serotonina tijekom perinatalnog razvoja, uz moguće dopaminom posredovane promjene i u motivaciji.

## **7. LITERATURA**

- Aleninaa N., Kikica D., Todirasa M., Mosienkoa V., Qadria F., Plehma R., Boye P., Vilianovitcha L., Sohrb R., Tennera K., Hortnaglb H., Badera M. (2008): Growth retardation and altered autonomic control in mice lacking brain serotonin. *PNAS* 106: 10332–10337.
- Anderson G. M., Horne W.C., Chatterjee D., Cohen D. J. (1990): The hyperserotonemia of autism. *Annals of the New York Academy of Sciences* 600: 331–342.
- Belzung C., Griebel G. (2001): Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: a review. *Behavioural Brain Research* 125: 141–149.
- Belzung C., Leman S., Vourc'h P., Andres C. (2005): Rodent models for autism: A critical review. *Drug discovery today: disease models* 2: 93–101.
- Berger M., Gray J. A., Roth B. L. (2009): The Expanded Biology of Serotonin *Annual Review of Medicine* 60: 355–366.
- Billett E. (2004): Monoamine Oxidase (MAO) in Human Peripheral Tissues, *NeuroToxicology* 25, 139-148
- Birdsall T. C. (1998): 5-Hydroxytryptophan: a clinically-effective serotonin precursor. *Alternative Medicine Review* 3: 271–280.
- Bolivar V. J., Walters S. R., Phoenix J. L. (2007): Assessing autism-like behavior in mice: Variations in social interactions among inbred strains. *Behavioural Brain Research* 176: 21–26.
- Borsini F., Podhorna J., Marazziti D. (2002): Do animal models of anxiety predict anxiolytic-like effects of antidepressants? *Psychopharmacology* 163:121–41.
- Brown G. R., Nemes C. (2008): The exploratory behaviour of rats in the hole-board apparatus: Is head-dipping a valid measure of neophilia?. *Behavioural Processes* 78: 442–448.
- Brudzynski S. M. (2001): Pharmacological and behavioral characteristics of 22 kHz alarm calls in rats. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 25: 611–617.
- Brunelli S. A. (2005): Selective breeding for an infant phenotype: rat pup ultrasonic vocalization (USV). *Behavior Genetics* 35: 53–65.
- Brunelli S. A., Hofer M. A. (2007): Selective breeding for infant rat separation-induced ultrasonic vocalizations: Developmental precursors of passive and active coping styles.



- Behavioural Brain Research 182: 193–207.
- Brust P., Friedrich A., Krizbai I. A., Bergmann R., Roux F., Ganapathy V., Johannsen B. (2000): Functional expression of the serotonin transporter in immortalized rat brain microvessel endothelial cells. *Journal of Neurochemistry* 74: 1241–1248.
- Caspi R., Foerster H., Fulcher C. A., Kaipa P., Krummenacker M., Latendresse M., Paley S., Rhee S. Y., Shearer A. G., Tissier C., Walk T. C., Zhang P., Karp P. D. (2008): The MetaCyc Database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of Pathway/Genome Databases. *Nucleic Acids Research* 36: 623– 631.
- Caston J., Yon E., Mellier D., Godfrey H. P., Delhay-Bouchaud N., Mariani J. (1998): An animal model of autism: behavioural studies in the GS guinea-pig. *European Journal of Neuroscience* 10: 2677–2684.
- Celada P., Artigas F. (1993): Monoamine oxidase inhibitors increase preferentially extracellular 5-hydroxytryptamine in the midbrain raphe nuclei. A brain microdialysis study in the awake rat. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 347, 583-590
- Chugani D. C., Muzik O., Behen M., Rothermel R., Janisse J. J., Lee J., Chugani H. T. (1999): Developmental changes in brain serotonin synthesis capacity in autistic and nonautistic children. *Annals of Neurology*: 287–295.
- Clarke K. A., Parker A. J., Stirk G. C. (1984): Locomotion in the rat after 5.hydroxy-L-tryptophan. *European Journal of Pharmacology* 98: 255–260.
- Cook E. H., Leventhal B. L. (1996): The serotonin system in autism. *Current opinions in pediatrics* 8: 348–354.
- Côte F., Thevenot E., Fligny C., Fromes Y., Darmon M., Ripoché MA., Bayard E., Hanoun N., Saurini F., Lechat P., Dandolo L., Hamon M., Mallet J., Vojdani G. (2003): Disruption of the nonneuronal tph1 gene demonstrates the importance of peripheral serotonin in cardiac function. *PNAS* 100: 13525–13530.
- Crawley J. N. (2004): Designing mouse behavioral tasks relevant to autistic-like behaviors. *MRDD Research Reviews* 10: 248–58.
- Crawley J. N. (2007a): Motor functions; Learning and memory; Social behavior; Emotional behaviors: animal models of psychiatric diseases. U: What's wrong with my mouse? Behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice. A John Wiley & Sons, Inc.,

- Publication, Hoboken, New Jersey, 62–85; 110–163; 206–225; 226–265.
- Crawley J. N. (2007b): Mouse Behavioral Assays Relevant to the Symptoms of Autism. *Brain Pathology* 17: 448–459.
- Crawley J. N., Chen T., Puri A., Washburn R., Sullivan T. L., Hill J. M., Young N. B., Nadler J. J., Moy S. S., Young L. J., Caldwell H. K., Young W. S. (2007): Social approach behaviors in oxytocin knockout mice: Comparison of two independent lines tested in different laboratory environments. *Neuropeptides* 41: 145–163.
- de Barros Viana M., Zangrossi H., Massaro Onusic G. (2008): 5-HT<sub>1A</sub> receptors of the lateral septum regulate inhibitory avoidance but not escape behavior in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 89: 360–366.
- DiCicco-Bloom E., Lord C., Zwaigenbaum L., Courchesne E., Dager S.R., Schmitz C., Schultz R. T., Crawley J. N., Young L. J. (2006): The Developmental Neurobiology of Autism Spectrum Disorder. *The Journal of Neuroscience* 26: 6897–6906.
- Dolenec P. (2009): Fiziološke posljedice perinatalne primjene prekursora serotonina u štakora. Diplomski rad, Biološki odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu.
- Frank M. G., Stryker M. P., Tecott L. H. (2002): Sleep and sleep homeostasis in mice lacking the 5-HT<sub>2c</sub> receptor. *Neuropsychopharmacology* 27: 869–873.
- Frazer A., Hensler J. G. (1999): Serotonin U: Siegel G. J. (ur.) *Basic neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects*. Lippincott–Raven Publishers, 227 East Washington Square, Philadelphia: 227–248.
- Gerlai R. (1998): A new continuous alternation task in T-maze detects hippocampal dysfunction in mice: A strain comparison and lesion study. *Behavioural Brain Research* 95: 91–101.
- Gould T. D., Gottesman I. I. (2006): Psychiatric endophenotypes and the development of valid animal models. *Genes, brain and behavior* 5: 113–119.
- Green A.R., Youdim M.B. (1975): Effects of monoamine oxidase inhibition by clorgyline, deprenil or tranylcypromine on 5-hydroxytryptamine concentrations in rat brain and hyperactivity following subsequent tryptophan administration, *British Journal of Pharmacology* 55, 415-422

- Hashimoto S., Inoue T., Koyanama T. (1999): Effects of conditioned fear stress on serotonin neurotransmission and freezing behavior in rats. *European Journal of Pharmacology* 378: 23–30.
- Holz R. W., Fisher S. K. (1999): Synaptic transmission and cellular signaling: an overview. U: Siegel G. J. (ur.) *Basic neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects*. Lippincott–Raven Publishers, Philadelphia, str. 167–184.
- Hranilović D., Bujas-Petković Z., Tomičić M., Bordukalo-Nikšić T., Blažević S., Čičin-Šain L. (2009): Hyperserotonemia in autism: activity of 5-HT-associated platelet proteins. *Journal of Neural Transmission* 116: 493–501.
- Hranilović D., Čičin-Šain L., Bordukalo-Nikšić T., Jernej B. (2005): Rats with constitutionally upregulated/downregulated platelet 5-HT transporter: Differences in anxiety-related behavior. *Behavioural Brain Research* 165: 271–277.
- Hunt P. R., Aggleton J. P. (1998): An examination of the spatial working memory deficit following neurotoxic medial dorsal thalamic lesions in rats. *Behavioural Brain Research* 97: 129–141.
- Jimenez-Trejo F., Tapia-Rodriguez M., Queiroz D. B. C., Padilla P., Avellar M. C. W., Rivas Manzano P., Manjarrez-Gutierrez G., Gutierrez-Ospina G. (2007): Serotonin Concentration, Synthesis, Cell Origin, and Targets in the Rat Caput Epididymis During Sexual Maturation and Variations Associated With Adult Mating Status: Morphological and Biochemical Studies. *Journal of Andrology* 28: 136–149.
- Jimerson D. C., Lessem M. D., Kaye W. H., Hegg A. P., Brewerton T.D. (1990): Eating disorders and depression: is there a serotonin connection?. *Biological Psychiatry* 28: 443–454.
- Johnston J.P. (1968): Some observations upon a new inhibitor of monoamine oxidase in brain tissue, *Biochemical Pharmacology* 17, 1285-1297
- Kahne D., Tudorić A., Borella A., Shapiro L., Johnstone F., Huang W., Whitaker-Azmitia P. M. (2002): Behavioral and magnetic resonance spectroscopic studies in the rat hyperserotonemic model of autism. *Physiology & Behavior* 75: 403–410.
- Kennett G. A., Bright F., Trail B., Baxter G. S., Blackburn T. P. (1996): Effects of the 5-HT<sub>2B</sub> receptor agonist, BW 723C86, on three rat models of anxiety. *British Journal of Pharmacology* 117: 1443–1448.

- Kolb B., Whishaw I. Q. (2001): How the neurons communicate and adapt?; How do we learn and remeber?. U: An Introduction to Brain and Behavior. Worth Publishers, New York: 148–185; 482–519.
- Kshama D., Hrishikeshavan H.J., Shanbhogue R., Munonyedi U.S. (1990): Modulation of baseline behavior in rats by putative serotonergic agents in three ethoexperimental paradigms. *Behavioral and Neural Biology* 54:234–53.
- Laterra J., Keep R., Betz L. A., Goldstein G. W. (1999): Blood—brain—cerebrospinal fluid barriers. U: Siegel G. J. (ur.) *Basic neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects*. Lippincott–Raven Publishers, Philadelphia: 559–575.
- Levin E. D., Christopher N. C., Brrigs S. J. (1997): Chronic nicotinic agonist and antagonist effects on T-maze alternation. *Physiology & Behavior* 61: 863–866.
- Lord C., Cook E. H., Leventhal B. L., Amaral D. G. (2000): Autism spectrum disorders. *Neuron* 28: 355– 363.
- Lucki I. (1998): The spectrum of behaviors influenced by serotonin. *Biological Psychiatry*. 44: 151–162.
- McNamara I. M., Borella A. W., Bialowas L. A., Whitaker-Azmitia P. M. (2007): Further studies in the developmental hyperserotonemia model (DHS) of autism: Social, behavioral and peptide changes. *Brain research* 1189: 203–214.
- Melikian H. E. (2004): Neurotransmitter transporter trafficking: endocytosis, recycling, and regulation. *Pharmacology & Therapeutics* 104: 17–27.
- Morrow J. D., Vikraman S., Imeri L., Opp M. R. (2008) Effects of serotonergic activation by 5-hydroxytryptophan on sleep and body temperature of C57BL/6J and interleukin-6-deficient mice are dose and time related. *SLEEP* 31: 21–33.
- Moy S. S., Nadler J. J., Poe M. D., Nonnemana R. J., Young N. B., Koller B. H., Crawley J. N., Duncana G. E., Bodfisha J. W. (2008): Development of a mouse test for repetitive, restricted behaviors: Relevance to autism. *Behavioural Brain Research* 188: 178–194.
- Moy S. S., Nadler J.J. (2008): Advances in behavioral genetics: mouse models of autism. *Molecular Psychiatry* 13: 4–26.
- Murcia C. L., Guldenb F., Herrupa K. (2005): A question of balance: a proposal for new mouse models of autism. *International Journal of Developmental Neuroscience* 23: 265–

275.

- Murphy D. L. (1990): Peripheral indices of central serotonin function in humans. *Annals of the New York Academy of Sciences* 600: 282–295.
- Nicolas L. B., Klein S., Prinssen E. P. (2007): Defensive-like behaviors induced by ultrasound: further pharmacological characterization in Lister hooded rats. *Psychopharmacology* 194: 243–252.
- Panagiotaropoulos T., Diamantopoulou A., Stamatakis A., Dimitropoulou M., Stylianopoulou F. (2009): Learning of a T-maze by rat pups when contact with the mother is either permitted or denied. *Neurobiology of Learning and Memory* 91: 2–12.
- Pandaranandakaa J., Poonyachoti S., Kalandakanond-Thongsongb S. (2009): Differential effects of exogenous and endogenous estrogen on anxiety as measured by elevated T-maze in relation to the serotonergic system. *Behavioural Brain Research* 198 :142–148.
- Parks C. L., Robinson P. S., Sibille E., Shenk T., Toth M. (1998): Increased anxiety of mice lacking the serotonin<sub>1A</sub> receptor. *PNAS* 95: 10734–10739.
- Ricceri L., Moles A., Crawley J. N. (2007): Behavioral phenotyping of mouse models of neurodevelopmental disorders: Relevant social behavior patterns across the life span. *Behavioural Brain Research* 176: 40–52.
- Savelieva K. V., Zhao S., Pogorelov V. M., Rajan I., Yang Q., Cullinan E., Lanthorn T. H. (2008): Genetic disruption of both tryptophan hydroxylase genes dramatically reduces serotonin and affects behavior in models sensitive to antidepressants. *PLoS ONE* 3: e3301.
- Schneider T., Przewłocki R. (2005): Behavioral Alterations in Rats Prenatally Exposed to Valproic Acid: Animal Model of Autism. *Neuropsychopharmacology* 30: 80–89.
- Schwartz R. K. W., Borta A. (2005): Analysis of behavioral asymmetries in the elevated plus-maze and in the T-maze. *Journal of Neuroscience Methods* 141: 251–260.
- Shair H. N. (2007): Acquisition and expression of a socially mediated separation response. *Behavioural Brain Research* 182: 180–192.
- Simonson M., Stephan J. K., Hanson H. M., Chow B. F. (1971): Open Field Studies in Offspring of Underfed Mother Rats. *Journal of Nutrition* 101: 331–336.
- Sleight A.J., Marsden C.A., Martin K.F., Palfreyman M.G. (1988): Relationship between extracellular 5-hydroxytryptamine and behaviour following monoamine oxidase

- inhibition and L-tryptophan, *Drugs*, 1988, 303-310
- Spowart-Manning L., Staay F.J. van der (2004): The T-maze continuous alternation task for assessing the effects of putative cognition enhancers in the mouse. *Behavioural Brain Research* 151: 37–46.
- Sunanda, Shankaranarayana B. S., Raju T. R. (2000): Chronic restraint stress impairs acquisition and retention of spatial memory task in rats. *Current science* 79: 1581–1584.
- Tanimura Y., Yang M. C., Lewis M. H. (2008): Procedural learning and cognitive flexibility in a mouse model of restricted, repetitive behaviour. *Behavioural Brain Research* 189: 250–256.
- Thomas D. R., Melotto S., Massagrande M., Gribble A. D., Jeffrey P., Stevens A. J., Deeks N. J., Eddershaw P. J., Fenwick S. H., Riley G., Stean T., Scott C. M., Hill M. J., Middlemiss D. N., Hagan J. J., Price G. W., Forbes I. T. (2003): SB-656104-A, a novel selective 5-HT<sub>7</sub> receptor antagonist, modulates REM sleep in rats. *British Journal of Pharmacology* 139: 705–714.
- Turner E. H., Loftis J. M., Blackwell A. D. (2006): Serotonin a la carte: supplementation with the serotonin precursor 5-hydroxytryptophan. *Pharmacology & Therapeutics* 109: 325–338.
- Tvrdeic A., Kocevski D. (2008): Does behavioral response to novelty influence paw withdrawal latencies in repeated Hargreaves test? *Periodicum biologorum* 110: 95–100.
- Wakayama K., Ohtsuki S., Takanaga H., Hosoya K., Terasak T. (2002): Localization of norepinephrine and serotonin transporter in mouse brain capillary endothelial cells. *Neuroscience Research* 44: 173–180.
- Watts S. W., Priestley J. R. C., Thompson J. M. (2009): Serotonylation of Vascular Proteins Important to Contraction. *PLoS ONE* 4: e5682.
- Whitaker-Azmitia P. M. (2001): Serotonin and brain development: Role in human developmental diseases. *Brain Research Bulletin* 56: 479–485.
- Whitaker-Azmitia P. M. (2005): Behavioral and cellular consequences of increasing serotonergic activity during brain development: a role in autism?. *International Journal of Developmental Neuroscience* 23: 75–83.
- Whitaker-Azmitia P. M., Druse M., Walker P., Lauder J. M. (1996): Serotonin as a

developmental signal. Behavioural Brain Research 73: 19–29.

Wöhr M., Borta A., Schwarting R. K. W. (2005): Overt behavior and ultrasonic vocalization in a fear conditioning paradigm: A dose– response study in the rat. Neurobiology of Learning and Memory 84: 228–240.